

Karin dos Santos

**CARACTERIZAÇÃO *IN SILICO* DA SUPERFAMÍLIA  
DE RECEPTORES NUCLEARES EM *Crassostrea gigas*  
(Thunberg, 1793)**

Trabalho de conclusão de curso  
submetido à Universidade Federal de  
Santa Catarina para a obtenção do  
Grau de bacharel em Ciências  
Biológicas.  
Orientador: Prof. Dr. Guilherme  
Razzera Maciel.

Florianópolis  
2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

dos Santos, Karin  
CARACTERIZAÇÃO IN SILICO DA SUPERFAMÍLIA DE  
RECEPTORES NUCLEARES EM *Crassostrea gigas*  
(Thunberg, 1793) / Karin dos Santos ; orientador,  
Guilherme Razzera, 2018.  
98 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -  
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de  
Ciências Biológicas, Graduação em Ciências Biológicas,  
Florianópolis, 2018.

Inclui referências.

1. Ciências Biológicas. 2. Biologia estrutural.  
3. Receptor Nuclear. 4. Ecotoxicologia. I. Razzera,  
Guilherme. II. Universidade Federal de Santa  
Catarina. Graduação em Ciências Biológicas. III.  
Título.

Karin dos Santos

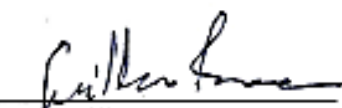
**CARACTERIZAÇÃO IN SILICO DA  
SUPERFAMÍLIA DE RECEPTORES NUCLEARES  
EM Crassostrea gigas (Thunberg, 1793).**


Este Trabalho Conclusão de Curso foi julgado adequado  
para obtenção do Título de Bacharel e aprovado em sua  
forma final.

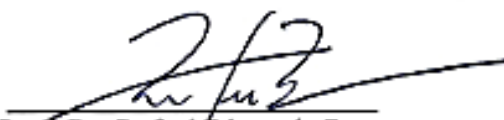
Florianópolis, 12 de novembro de 2018.

Prof Dr. Carlos Roberto Zanetti  
Coordenador do Curso

**Banca Examinadora:**

  
Prof. Dr. Guilherme Razzera Maciel  
Orientador  
Universidade Federal de Santa Catarina

  
Prof. Dr. Glauber Wagner  
Universidade Federal de Santa Catarina

  
Prof. Dr. Rafael Diego da Rosa  
Universidade Federal de Santa Catarina

## AGRADECIMENTOS

Tanto no mundo acadêmico como na vida, nada fazemos sozinhos. Por isso este trabalho conta com participação direta e indireta de várias pessoas especiais. Entre elas gostaria de agradecer ao meu orientador Guilherme Razzera pela parceria nestes últimos três anos de laboratório, por toda a paciência e preocupação com cada etapa na realização deste trabalho, como recursos financeiros, disponibilidade de máquinas, parcerias, e principalmente por ter se mantido presente na minha orientação (nossas várias reuniões por Skype) enquanto estive fora se especializando.

Um agradecimento especial aos meus pais (Antônio, Maria e Dionísia) pelo amor incondicional, apoio, encorajamento e preocupação durante o período da faculdade. Obrigada também por custearem a minha formação desde pequena até aqui. Ser bióloga não seria possível sem a ajuda de vocês. Obrigada por tudo!

Meu namorado e companheiro Lucas, que estive ao meu lado durante todos os momentos de alegria, tristeza e ansiedades. Sempre me apoiando, tranquilizando e ajudando a seguir em frente. Ter você ao meu lado foi fundamental para que nunca desistisse de nada. Obrigada por me dar coragem e sonhar meus sonhos comigo.

Ao professor Afonso Bainy pela concepção do projeto de iniciação científica, por disponibilizar os recursos do LABCAI, pela bolsa PIBIC e por toda colaboração nas discussões que permeiam este trabalho.

Guilherme Toledo pela dedicação e tempo empregados em ensinar o mais básico em informática, como abrir um terminal do Linux. Sem sua dedicação nada disso seria possível. Também ao Nestor Wendt por me ensinar as técnicas de Bio estrutural, por sempre me salvar dos apertos da

computação e por ser um dos grandes presentes que a bioinformática me deu. Foi um honra trabalhar ao seu lado!

As minhas companheiras de trabalho e melhores amigas Julie e Laura. Trabalhar com vocês foi outro grande presente da vida! Obrigada por toda ajuda, reuniões, força e carinho que tornaram esses anos de laboratório mágicos. Julie, serei sempre grata pela nossa convivência, nossas madrugadas estudando e fazendo trabalhos da graduação (PPCCs enormes porque nunca apreendemos a fazer trabalhos fáceis...). Obrigada por tudo!

Laura, Tomás e Gabriel pelos cafés e conselhos que tornaram essa caminhada mais leve. A amizade de vocês foi muito importante no período de finalização deste trabalho.

E por fim, a UFSC pela estrutura que disponibiliza aos seus estudantes e este ambiente incrível de crescimento e formação!

## RESUMO

Constantemente produtos químicos são produzidos em larga escala e introduzidos no ambiente, contaminando principalmente os ecossistemas aquáticos. Uma vez que o número de xenobióticos é crescente, a demanda por estudos toxicológicos tornam as técnicas de testes *in vivo* difíceis de serem executadas. Há uma necessidade então do desenvolvimento de abordagens que selecionem e priorizem quais compostos devem passar por testes mais detalhados. Receptores nucleares (NRs) são tipicamente alvo de compostos sintéticos que imitam ou antagonizam a ação de ligantes endógenos. Nesse estudo propomos uma metodologia de caracterização estrutural de NRs para a ostra do pacífico, organismo sentinela e de importante interesse para zonas costeiras de Santa Catarina. Nossos resultados mostram que a partir de técnicas de modelagem comparativa e caracterização de cavidades é possível classificar NRs de um organismo não modelo em potencialmente moduladas e não moduladas. Apresentamos também uma alternativa promissora para triagem de ligantes com base nas características volumétricas do sítio ativo, com destaque especial para o NR CgROR que se mostrou favorável a interações com colesterol e tamoxifeno.

**Palavras-chave:** Biologia estrutural. Receptor Nuclear. Ecotoxicologia.

## ABSTRACT

Chemicals are regularly produced on a large scale and introduced into the aquatic environment. Since the number of xenobiotics is increasing, the demand for toxicological studies makes the in vitro and in vivo tests unfeasible. In this sense, new approaches able to identify toxic compounds are necessary. The nuclear receptors (NRs) are typically targeted for synthetic compounds that mimic or antagonize the action of endogenous ligands. In this study, we propose a methodological approach for the structural characterization of NRs in the Pacific oyster, a sentinel organism and a crucial commercial organism for Santa Catarina. Our comparative modeling data show that, from the protein cavity perspective, it is possible to classify NRs from non-model organisms into potential modulated and non-modulated receptor. We also present a promising alternative for ligand screening based on the volumetric characteristics of the active site, with focus on the NR CgROR that shows stable interactions with cholesterol and tamoxifen.

**Keywords:** Structural biology. Nuclear Receptor. Ecotoxicology.





## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Organização modular de um receptor nuclear (A) Estrutura de um receptor nuclear com quatro domínios modulares: região N-terminal com função de ativação (AF-1), domínio ligante de DNA (DBD) com dois dedos de zinco, uma dobradiça flexível (Hinge) e o domínio ligação com o ligante (LBD). (B) Os receptores nucleares de detecção xenobiótica se ligam com heterodímeros como RXR que se ligam no domínio DBD, a hexâmeros de nucleotídeos AGGTCA com espaçamentos variáveis. ....	23
<b>Figura 2</b> - Possíveis vias de transporte de cafeína no ambiente. ....	25
<b>Figura 3</b> - Fluxograma do passo a passo empregado na metodologia. ....	31
<b>Figura 4</b> - Alinhamento tridimensional entre as estruturas de CgER-modelo (verde) e CgER cristal 4N1Y (azul). ....	35
<b>Figura 5</b> – Definição das regiões de $\alpha$ -hélices e folhas- $\beta$ entre modelos. (A) Em verde CgNR5A com todas as 12 $\alpha$ -hélices bem definidas mais a região de grampo- $\beta$ . (B) Estrutura do cristal de 4ONI (HmNR5A) bem definidas sem ausência de regiões importantes no cristal.....	37
<b>Figura 6</b> - Definição das regiões típicas de um Receptor Nuclear. Em verde o modelo de CgER com 10 $\alpha$ -hélices, ausência da região H2 e uma H4 não bem definida assim como a estrutura cristalográfica de CgER em roxo. Enquanto o modelo de ER-humano (azul) não apresenta apenas o motivo H2. ....	38
<b>Figura 7</b> – (A) Molécula de estradiol, ligante endógeno clássico de ER. (B) Superfície de volume de ER humano (IGWR) suficientemente grande para comportar o hormônio estradiol. Superfície de volume do cristal de CgER (C) e do modelo gerado (D) ambas não comportando adequadamente o estradiol. ....	40

**Figura 8** – (A) alinhamento das sequências de ER humana e de *C. gigas* com destaque para os resíduos que compõem a cavidade do sítio de ligação segundo o programa CASTp. (B) Detalhe para os resíduos da cadeia lateral que colidem ou ocupam o espaço da cavidade. Em azul a cadeia lateral de ER humano com maior distanciamento em relação ao estradiol. Em verde o modelo de *C.gigas* colidindo o resíduo Phe209 com o ligante. Em roxo a cadeia lateral do cristal de *C.gigas* mais fechada e próxima em relação ao ligante, colidindo os resíduos Phe208 e Phe209 com o estradiol. ....42

**Figura 9** – Esquema de uma possível ferramenta online para caracterização estrutural de toda uma superfamília de proteínas, direcionando testes em bancada através de várias etapas de filtros. ....52

**Figura 10**- Em verde o modelo de CgTHR com 11  $\alpha$ -hélices bem definidas e um grampo- $\beta$ . Já em azul o cristal de 1N46 com as mesmas regiões bem definidas e algumas falhas na região de *loop* entre H1 e H2. Ambas as estruturas não apresentam formação de H2. ....85

**Figura 11** – À esquerda em verde o modelo CgRAR e a esquerda em azul a estrutura experimental de 1XDK. Ambos os modelos tridimensionais apresentam um grampo- $\beta$  e 10  $\alpha$ -hélices com uma H4 não definida e ausência de H2. Também diferem quanto a região de *loop* entre H1 e H3, sendo o *loop* de CgRAR maior do que 1XDK. ....86

**Figura 12** – Ambas as estruturas, CgHNF4 em verde e 4IQR em azul, apresentam 11  $\alpha$ -hélices mais um grampo- $\beta$  e a região H2 é ausente. ....87

**Figura 13** – Em verde à esquerda, CgRXR e em azul à direita 1XIU. As duas estruturas apresentam 11  $\alpha$ -hélices mais um grampo- $\beta$  com a ausência de H2 e formação discreta de H4. ....88

**Figura 14** – Em verde o modelo de CgROR com a formação de um grampo- $\beta$ , 12  $\alpha$ -hélices e mais uma H2' adicional típica desta família. O cristal de 4S15 em azul

apresenta as mesmas regiões, porém, a H2 não é tão bem  
defina como em CgROR. .... 89



## LISTA DE QUADROS

**Quadro 1** – Classificação geral entre potencialmente modulado (PM) e potencialmente não modulado (PNM). Para cada membro da superfamília são apresentadas as cavidades e seus ligantes com respectivos códigos de identificação.....43



## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1** – Medidas de qualidade segundo protocolo de (BENKERT; BIASINI; SCHWEDE, 2011) para modelos de predição. Valores de QMEAN próximos de 0 são considerados de alta qualidade e menores do que -4 de baixa qualidade. ....32

**Tabela 2** - Métricas de qualidade estrutural para os modelos construídos e ângulos de torção permitidos.....33

**Tabela 3** – Quantificação dos volumes das cavidades para ER.....40

**Tabela 4** - Valores de energia livre ( $\Delta G$ ) entre Receptores Nucleares de *C. gigas* e os diferentes ligantes. ....48

**Tabela 5** – *Redocking*, valores de energia livre ( $\Delta G$ ) para os Receptores Nucleares dos cristais.....49





## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<i>C.gigas</i>	<i>Crassostrea gigas</i>
9CR	(9cis)-ácido retinóico
CLR	Colesterol
CYP	Citocromo P450
DAO	Ácido Láurico
DBD	DNA Binding Domain
DICL	Diclofenaco
ER	Receptor de estrógeno
His	Histidina
HNF4	Fator de hepatócito 4
IBU	Ibuprofeno
Ile	Isoleucina
LBD	Ligand Binding Domain
MYR	Ácido mirístico ou tetradecanóico
NR	Receptor nuclear
PARA	Paracetamol
PDB	Banco de Dados de Proteínas
Phe	Fenilalanina
PM	Potencialmente modulado
PNM	Potencialmente não modulado
RAR	Receptor de ácido retinóico
REA	Ácido retinóico
RMSD	Raiz média quadrática
ROR	Receptor órfão de retinóide
RXR	Receptor de retinóide X
T3	Triiodotironina
T4	Tetraiodotironina
TAM	Tamoxifeno
THR	Receptor de hormônio da tireoide
$\Delta G$	Delta G

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>21</b>
1.1	<i>Crassostrea gigas</i> COMO BIOINDICADOR DE MONITORAMENTO AMBIENTAL .....	21
1.2	RECEPTORES NUCLEARES .....	22
1.3	CONTAMINATES EMERGENTES .....	24
1.4	BIOINFORMÁTICA ESTRUTURAL .....	26
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>28</b>
2.1	OBJETIVO GERAL.....	28
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	28
<b>3</b>	<b>METODOLOGIA.....</b>	<b>29</b>
3.1	MODELAGEM COMPARATIVA .....	29
3.2	CALCULO DE CAVIDADES .....	29
3.3	BUSCA POR LIGANTES .....	30
3.4	CLASSIFICAÇÃO.....	30
3.5	<i>DOCKING</i> MOLECULAR .....	31
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>32</b>
4.1	MODELOS TRIDIMENSIONAIS .....	32
4.2	CARACTERIZAÇÃO DO SÍTIO DE LIGAÇÃO ...	39
4.3	CLASSIFICAÇÃO: POTENCIALMENTE MODULADOS E NÃO MODULADOS. ....	43
4.3.1	<b>THR .....</b>	<b>45</b>
4.3.2	<b>RAR E RXR .....</b>	<b>45</b>
4.3.3	<b>ROR .....</b>	<b>46</b>
4.3.4	<b>NR2A-HNF4.....</b>	<b>47</b>
4.3.5	<b>NR5A .....</b>	<b>47</b>
4.4	POTENCIAL DE INTERAÇÃO NA CAVIDADE..	48

<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>51</b>
<b>5.1</b>	<b>PERSPECTIVAS .....</b>	<b>51</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>53</b>
	<b>APÊNDICE A – Gráficos de Ramachandran para os diferentes Receptores Nucleares. ....</b>	<b>71</b>
	<b>APÊNDICE B – Modelos comparativos e seus respectivos <i>templates</i>. ....</b>	<b>85</b>
	<b>APÊNDICE C – Valores calculados para superfície de área e volume para cada modelo e seu respectivo cristal de modelagem. ....</b>	<b>90</b>
	<b>APÊNDICE D - Lista do levantamento de ligantes experimentais para cada membro da superfamília de Receptores Nucleares. ....</b>	<b>91</b>
	<b>APÊNDICE E – Lista de ligantes selecionados para <i>docking</i> molecular. ....</b>	<b>95</b>
	<b>ANEXO A – Colaboração em artigos científicos..</b>	<b>97</b>



# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 *Crassostrea gigas* COMO BIOINDICADOR DE MONITORAMENTO AMBIENTAL

*Crassostrea gigas*, também conhecida como ostra do pacífico, apresenta importante interesse econômico, pois além de ser a ostra mais cultivada no mundo, também é considerada um importante organismo sentinela (WESSEL et al., 2007). Esta espécie contém características que a torna importante para o biomonitoramento de xenobióticos, tais como sua anatomia, ciclo de vida, capacidade de bioacumulação de substâncias químicas, facilidade de manipulação em laboratório (COLLIN et al., 2010; ERNANDE et al., 2003; MIOSSEC; LE DEUFF; GOULLETQUER, 2009). Além disso, já teve seu genoma sequenciado, no qual mostrou uma complexidade genômica com relação a adaptação aos estresses ambientais (LI et al., 2018; ZHANG et al., 2012). Essas características juntamente com a importância na aquicultura fazem da ostra do Pacífico uma espécie modelo em estudos ecotoxicológicos.

Biomarcadores são amplamente utilizados no monitoramento ambiental, de forma a verificar a exposição ou efeito de xenobióticos nos organismos e são definidos como alterações bioquímicas, celulares, moleculares ou ainda, mudanças fisiológicas nas células, fluídos corpóreos, tecidos ou órgãos (LAM; GRAY, 2003). O uso de biomarcadores se faz importante no sentido de obter previamente, sinais de danos nos níveis de organização celular complexa e o potencial de antecipar tais mudanças os tornam importantes no alerta precoce, permitindo assim, o início de estratégias de biorremediação antes da ocorrência de danos ambientais irreversíveis (CAJARAVILLE et al., 2000; VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003). Nesse sentido, biomarcadores representam ferramentas cada vez mais reconhecidas mundialmente para avaliação de impactos causados por

poluição no meio marinho, incorporados inclusive em vários programas de monitoramento ambiental (CAJARAVILLE et al., 2000; VIARENGO et al., 2007).

## 1.2 RECEPTORES NUCLEARES

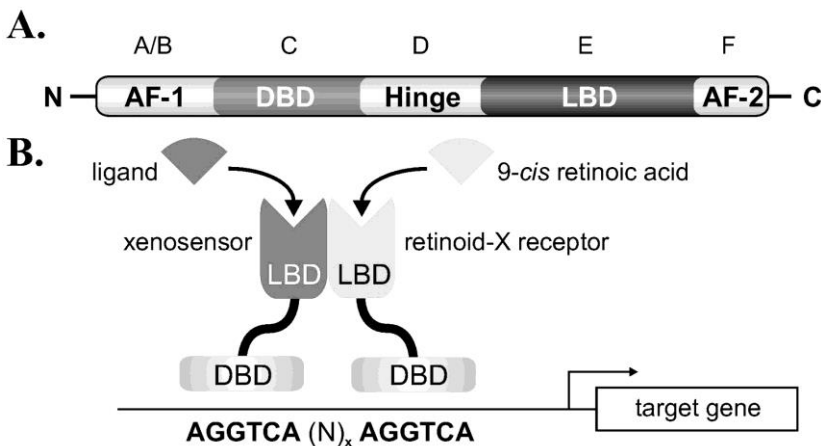
O controle biológico de processos-chave, como desenvolvimento e reprodução, é em grande parte atribuído a uma superfamília de fatores de transcrição independentes e dependentes de ligantes conhecidos como Receptores Nucleares (NRs). Na maioria dos casos, a ligação específica dos ligantes regula a atividade dos receptores nucleares. Os ligantes naturais desta superfamília são geralmente lipofílicos e incluem hormônios esteroides, ácidos biliares, ácidos graxos, certas vitaminas como a vitamina D e prostaglandinas (MCEWAN, 2009).

Dada a sua capacidade de acomodar os ligantes, os NRs são os principais alvos de compostos sintéticos que imitam ou antagonizam a ação de ligantes endógenos (SANTOS et al., 2018). Em resposta a estes compostos NRs modulam a transcrição de uma série de enzimas envolvidas em processo de detoxificação, tais como, os membros da família do citocromo P450 (CYP) (SAVAS; GRIFFIN; JOHNSON, 1999; XIE; EVANS, 2001). Os produtos dos genes CYP como CYP3A e CYP2B são essenciais para o metabolismo de hormônios esteroides e xenobióticos incluindo várias drogas (XIE et al., 2000). Essa capacidade de ser ativada por um ligante é de relevância crucial na área de ecotoxicologia. Estudos revelaram a participação de NRs em fenômenos como a feminização em peixes e impossex em gastrópodes (FOALE, 1993; RODRIGUES et al., 2006).

NRs em geral, apresentam a mesma organização modular (Figura 1), dividida em quatro domínios: a região N-terminal, que abriga a função de ativação (AF-1) em alguns receptores e é altamente variável; a região central de interação com o DNA

também denominada DBD (*DNA Binding Domain*), formada por dois dedos de zinco e que é mais conservada; uma região curta de conexão e flexão; e um domínio de interação com o ligante ou *Ligand Binding Domain* (LBD) que também possui a função de ativação (AF-2) (HANDSCHIN; MEYER, 2003).

**Figura 1** - Organização modular de um receptor nuclear (A) Estrutura de um receptor nuclear com quatro domínios modulares: região N-terminal com função de ativação (AF-1), domínio ligante de DNA (DBD) com dois dedos de zinco, uma dobradiça flexível (Hinge) e o domínio ligação com o ligante (LBD). (B) Os receptores nucleares de detecção xenobiótica se ligam com heterodímeros como RXR que se ligam no domínio DBD, a hexâmeros de nucleotídeos AGGTCA com espaçamentos variáveis.



Fonte: (HANDSCHIN; MEYER, 2003).

A partir da informação disponibilizada pelo genoma sequenciado de *C. gigas*, já foram identificados 43 receptores nucleares (VOGELER et al., 2014).

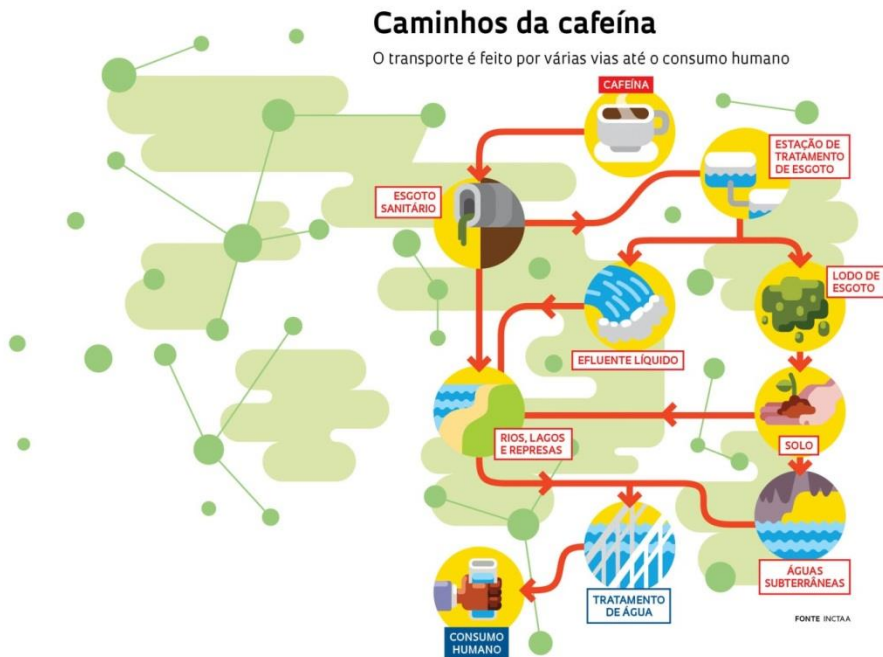
### 1.3 CONTAMINATES EMERGENTES

Nas últimas décadas, novas substâncias xenobióticas foram desenvolvidas e introduzidas no ambiente aquático (THOMAIDIS; ASIMAKOPOULOS; BLETSSOU, 2012), sendo muitas dessas retratadas como poluentes emergentes. Como exemplo, têm-se alguns fármacos, pesticidas, hormônios, nanomateriais e outros (CANELA et al., 2014; HUGGETT et al., 2003; KOLPIN et al., 2002). A contaminação do ambiente aquático por fármacos ocorre via lixiviação, águas residuais e pelas excretas dos pacientes e animais (KIM et al., 2007); (NIKOLAOU; MERIC; FATTA, 2007; DUSSAULT et al., 2008). Ao chegar às estações de tratamento não conseguem ser completamente removidos, tornando as águas contaminadas (DOKIANAKIS; KORNAROS; LYBERATOS, 2004; LANGFORD; THOMAS, 2009). Um bom exemplo desse tipo de contaminação pode ser exemplificado pela via de transporte da cafeína no meio ambiente, como mostra a Figura 2. O mesmo caminho de transporte pode ser extrapolado para fármacos uma vez que estes seguem as meias vias de contaminação.

Embora os medicamentos possuam uma meia-vida relativamente curta no ambiente a entrada constante de fármacos, mesmo que em pequenas concentrações, pode induzir efeitos tóxicos nos organismos. Estudos demonstram que as interações com os sítios de ação, em organismos geneticamente semelhantes aos humanos, podem resultar em toxicidade sub-letal, como câncer e anomalias reprodutivas (HERNANDO et al., 2006; KIM et al., 2007; KOLPIN et al., 2002).



**Figura 2** - Possíveis vias de transporte de cafeína no ambiente.



Fonte: (“Contaminação emergente | Revista Pesquisa Fapesp”, [s.d.])

## 1.4 BIOINFORMÁTICA ESTRUTURAL

O avanço na computação científica nos últimos anos, principalmente ao que se refere à capacidade de processamento, tem permitido novas análises no estudo de biomoléculas. Os projetos de sequenciamento de genoma completo tem gerado um número crescente de informações, esperando-se que em um longo prazo a genômica estrutural produza um grande número estruturas resolvidas experimentalmente, resultando cada vez mais em referências adequadas de estruturas (*templates*) podendo-se gerar modelos 3D por homologia mais realistas (EVERS; GOHLKE; KLEBE, 2003). Apesar de se saber que a função de uma proteína está diretamente relacionada com a sua estrutura tridimensional e dinâmica de movimento, no momento existem poucas estruturas resolvidas experimentalmente, considerando a enorme quantidade de dados de sequência disponíveis (BERMAN et al., 2000). Portanto, a modelagem 3D passa a ser uma alternativa para obtenção de informações tridimensionais de proteínas.

Um dado muito importante na abordagem de modelagem comparativa é o fato de que a similaridade entre sequências é normalmente menos preservada do que a similaridade estrutural (HÖLTJE et al., 2003). Para alcançar bons resultados na otimização de protótipos, além da modelagem comparativa, protocolos computacionais podem envolver, simulações de *docking* e dinâmica molecular (MD) (PARK; LEE, 2004).

Considera-se que proteínas apresentam graus de flexibilidade particulares e que as interações ligante-proteína tendem a ter um encaixe induzido, entretanto, para uma abordagem mais completa se faz necessária a análise da paisagem energética multimensional (Energy landscape) que defina as probabilidades relativas dos estados conformacionais (termodinâmica) e as barreiras energéticas entre eles (cinética) (HENZLER-WILDMAN; KERN, 2007).

Vários esquemas para o cálculo de barreira energética livre podem ser utilizados por abordagens computacionais. Uma delas é o método clássico de dinâmica molecular, na qual são geradas trajetórias através de integrações das equações de movimento de Newton e as forças são derivadas negativas do potencial de função. Outra abordagem, no entanto, é o método de Monte Carlo que gera a trajetória das amostras de acordo com a distribuição de Boltzmann, porém, esta só fornece estatísticas significativas para os estados termicamente estáveis não sendo adequado para estados de transição (YOO, 2004). No geral simulações computacionais buscam considerar os aspectos dinâmicos do complexo fármaco-receptor nos estudos de modelagem molecular, com o intuito de tornar o mais real possível a descrição dos processos biológicos (ALONSO; BLIZNYUK; GREARY, 2006).

Apesar de sua grande importância econômica, até o momento existem apenas nove estruturas de *C. gigas* depositadas no banco de dados de proteínas (PDB). Tais estruturas correspondem a sete Natterin-3, uma Defensina e um Receptor Nuclear de Estrógeno (BRIDGHAM et al., 2014; GUEGUEN et al., 2006; JIANG et al., 2017; UNNO et al., 2016). Em contra partida quando buscamos por estruturas de organismos como *Homo sapiens*, por exemplo, o que se encontra são 42.047 estruturas disponíveis. Estas diferenças numéricas evidenciam a escassez de informações estruturais para *C. gigas*, o que tem se mostrado algo muito comum nos invertebrados, sendo estes então, organismos não modelo para estudos estruturais.

Diversos estudos em ecotoxicologia têm empregado técnicas de *docking* molecular e *virtual screening* como ferramenta de testes de predição de efeitos tóxicos nos organismos (WALKER; MCELDFOWNEY, 2013; YANG et al., 2010; ZHOU et al., 2016). Neste trabalho utilizamos técnicas de bioinformática estrutural para avaliar o potencial de modulação de membros da família de Receptores Nucleares,

mostrando que através do estudo de suas cavidades é possível avaliar o potencial de modulação por ligantes endógenos e xenobióticos.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Caracterizar estruturalmente a superfamília de receptores nucleares em *C. gigas* assim como identificar possíveis ligantes endógenos e xenobióticos por meio de técnicas de bioinformática estrutural.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- I. Construir modelos tridimensionais para os domínios LBD dos receptores nucleares de *C.gigas*;
- II. Caracterizar cavidades de ligação LBD através de análise funcional comparativa entre os domínios LBD de *C.gigas* e classificar entre receptores modulados ou não modulados;
- III. Avaliar a interação dos Receptores de *C.gigas* com fármacos de interesse ecotoxicológico;

### 3 METODOLOGIA

Um esquema geral da metodologia empregada pode ser observado na Figura 3.

#### 3.1 MODELAGEM COMPARATIVA

Os modelos tridimensionais, para os domínios LBD foram construídos através da plataforma SwissModel (BERTONI et al., 2017; BIENERT et al., 2017; GUEX; PEITSCH; SCHWEDE, 2009; WATERHOUSE et al., 2018), usando o modo de alinhamento. Primeiramente as sequências identificadas foram submetidas ao BLASTp (CAMACHO et al., 2009) utilizando como referência o banco de dados PDB (BERMAN et al., 2000) e os melhores *hits* alinhados usando o programa ClustalW2 2.0 (LARKIN et al., 2007). Foram selecionadas como moldes as estruturas que possuísem maior semelhança com o transcrito, que apresentassem ligante na cavidade do sítio e que tivessem sido geradas por técnica de cristalografia de raios X. Já a qualidade dos modelos construídos foi estimada através do *score* QMEAN (BENKERT; BIASINI; SCHWEDE, 2011). Além disso, o potencial de gerar uma estrutura de confiabilidade também foi avaliado por meio de análises de TM-score (XU; ZHANG, 2010; ZHANG; SKOLNICK, 2004), gráficos de Ramachandran (LOVELL et al., 2003) e comparações com estruturas homólogas depositadas no PDB (BERMAN et al., 2000).

#### 3.2 CALCULO DE CAVIDADES

As cavidades foram calculadas pelo *software* CASTp 3.0 (TIAN et al., 2018), com *radius probe* de 1.3 Å como valor padrão para cálculo de área de superfície acessível ao solvente. O *software* identificou todos os bolsões de superfície, cavidades interiores e canais dos receptores, fornecendo um

delineamento detalhado de todos os resíduos que participam da sua formação, além de medir os volumes. A partir destas informações foi possível gerar figuras pelo PyMOL (SCHRÖDINGER, 2017) .

### 3.3 BUSCA POR LIGANTES

Os ligantes presentes nas estruturas experimentalmente resolvidas, utilizados na etapa de modelagem, serviram como parâmetro para uma extensa busca por ligantes endógenos e sintéticos de receptores nucleares no Banco de Dados de Proteínas (PDB) (BERMAN et al., 2000). Já a biblioteca de ligantes xenobióticos foi obtida a partir do banco de compostos para *virtual screening*, ZINC (IRWIN et al., 2012).

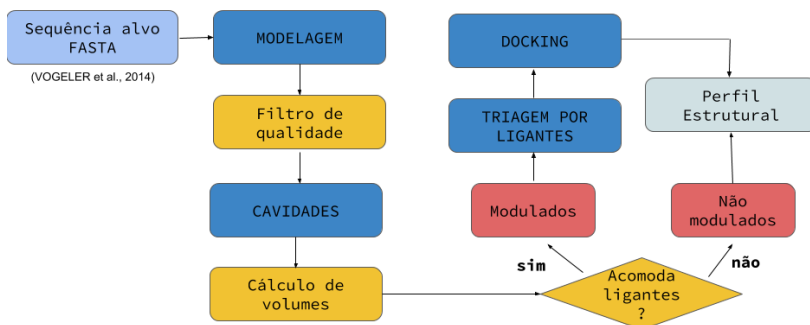
### 3.4 CLASSIFICAÇÃO

Através do *software* CASTp 3.0 (TIAN et al., 2018) os resíduos que compõem o sítio de ligação foram identificados e anotados. Posteriormente com o auxílio do programa PyMOL (SCHRÖDINGER, 2017) tais resíduos foram selecionados na estrutura tridimensional do modelo gerado e uma superfície de área construída. Os diferentes ligantes foram então posicionados internamente a essas superfícies e foi verificado se estes se acomodavam ou não com o volume disponível em cada cavidade. Os receptores cuja cavidade fosse capaz de comportar os diferentes ligantes foi classificada como potencialmente modulada (PM), enquanto os que não apresentassem volume suficiente para acomodar um ligante foram classificados como potencialmente não modulados (PNM).

### 3.5 DOCKING MOLECULAR

Os modelos classificados como PM foram selecionados para a etapa de teste de *docking* molecular com os diferentes ligantes, endógenos e fármacos. As caixas de atracamento foram construídas pelo Chimera 10.1 (CHIMERA, 2004), as quais foram centralizadas na posição dos ligantes de seus respectivos cristais, também consideramos flexíveis os aminoácidos completamente internos as caixas. Posteriormente as estruturas dos receptores nucleares e dos ligantes foram preparadas por *scripts* do pacote AutoDock Tools. Para a realização do *docking* e visualização dos resultados foi utilizado o programa AutoDock Vina (TROTT; OLSON, 2010). O programa *Pose View* (FRICKER; GASTREICH; RAREY, 2004; STIERAND; MAAß; RAREY, 2006) também foi utilizado para caracterização das interações no sítio de ligação.

**Figura 3-** Fluxograma do passo a passo empregado na metodologia.



## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 MODELOS TRIDIMENSIONAIS

Dentre os 43 transcritos de NRs reportados por Vogeler e colaboradores, foram selecionados sete modelos de acordo com parâmetros de qualidade dos mesmos, sendo que destes, o receptor de estrógeno CgNR3A, foi considerado modelo controle. A escolha dessa sequência como controle se deve ao fato de esta ser a única estrutura (4N1Y) de receptor nuclear de *C.gigas*, experimentalmente resolvida e depositada em banco de dados. A Tabela 1 contém as medidas da primeira avaliação de qualidade dos modelos gerados. Os valores de QMEAN para todos os modelos são maiores que -4, indicando boa qualidade. Também se observa nesta tabela que o grau de similaridade entre as sequências alvo e molde são maiores que 30%, ou seja, suficientes para gerar um modelo confiável.

**Tabela 1** – Medidas de qualidade segundo protocolo de (BENKERT; BIASINI; SCHWEDE, 2011) para modelos de predição. Valores de QMEAN próximos de 0 são considerados de alta qualidade e menores do que -4 de baixa qualidade.

	CgNR1A-TR	CgNR1B-RAR	CgNR1F-ROR	CgNR2A-HNF4	CgNR2B-RXR	CgNR3A-ER	CgNR5A
QMEAN	-3,10	-1,80	-2,23	-2,10	-0,69	-1,89	-0,98
Indentidade	0,40	0,53	0,39	0,53	0,58	0,36	0,42

Fonte: Próprio autor



Para medir a similaridade estrutural entre os modelos e seus respectivos moldes foram utilizadas as métricas observadas na Tabela 2.

**Tabela 2** - Métricas de qualidade estrutural para os modelos construídos e ângulos de torção permitidos.

	TM-score	RMSD (Å)	Ramachandran permitidos
CgNR1A	0,95062	1,17	94,4%
THRβ-Humano			94,8%
CgNR1B	0,98070	0,34	94,1%
RARβ-Mus musculus			87,7%
CgNR1F	0,95775	0,23	97,0%
RORα-Humano			98,8%
CgNR2A	0,98046	0,28	93,2%
HNF4α-Humano			93,4%
CgNR2B	0,99518	0,10	96,3%
RXR-Biomphalaria glabrata			94,1%
CgNR3A	0,88821	1,16	98,2%
ER-Humano			97,0%
CgNR3A	0,93892	1,44	98,2%
ER-Crassostrea gigas			99,6%
CgNR5A	0,93944	0,21	98,3%
NR5A-Humano			99,2%

Fonte: Próprio autor

A primeira delas, TM-score, com valores que variam entre 0 e 1. Valores abaixo de 0,17 correspondem a proteínas não relacionadas escolhidas aleatoriamente, enquanto que pontuações maiores que 0,5 correspondem à mesma dobra. Já

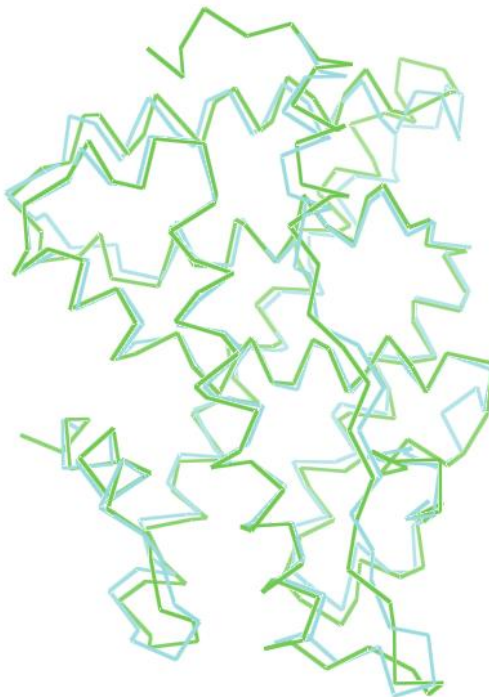
uma pontuação máxima de 1 indica a combinação perfeita entre duas estruturas. Nossos modelos apresentaram valores acima de 0,5 evidenciando mesmo *folding* entre estruturas.

O segundo parâmetro levado em consideração nesta etapa foi o cálculo de RMSD, uma medida que representa a distância entre dois números, no nosso caso, as coordenadas (x,y,z) para cada par de carbono alfa entre as estruturas molde e modelo. Nesse sentido os nossos valores de RMSD para todos os modelos mostraram-se baixos. Observe que modelo controle, CgNR3A-ER, o qual usou como base de modelagem a estrutura de 1GWR, receptor de estrógeno humano com 36% de identidade com a sequência de *C.gigas* apresenta os maiores valores de RMSD da Tabela 2. Entretanto, como é apresentado na Figura 4, observamos que o modelo gerado é muito próximo em relação ao *backbone* da estrutura já resolvida experimentalmente (4N1Y) de *C.gigas*, com pequenas variações em regiões de *loop*.

Como nem todos os pares de ângulos são possíveis dentro de uma estrutura proteica, em consequência á efeitos estéricos entre resíduos da cadeia lateral, analisamos também os ângulos proibitivos através do gráfico de Ramachandran (APÊNDICE A). Nossos resultados mostram que em geral, as restrições espaciais dos modelos gerados são muito próximas as restrições encontradas nas estruturas experimentais (Tabela 2). Contudo, apesar destes resultados iniciais terem se mostrado positivos, percebemos que a baixa qualidade de um cristal, utilizado na etapa de modelagem, poderia gerar uma estrutura incompleta sem necessariamente diminuir os valores qualidade apresentados anteriormente. Nesse sentido, fizeram-se necessárias análises adicionais nas quais levamos em consideração se o nossos modelos apresentavam estruturas típicas de um NR, presença de 11 a 12  $\alpha$ -hélices mais duas folhas- $\beta$  em forma de grampo (grampo- $\beta$ ). Sendo assim observamos cada receptor individualmente, comparando com

outras estruturas do PDB e atentando ao fato de que o número de  $\alpha$ -hélices é variável entre as famílias de receptores.

**Figura 4-** Alinhamento tridimensional entre as estruturas de CgER-modelo (verde) e CgER cristal 4N1Y (azul).



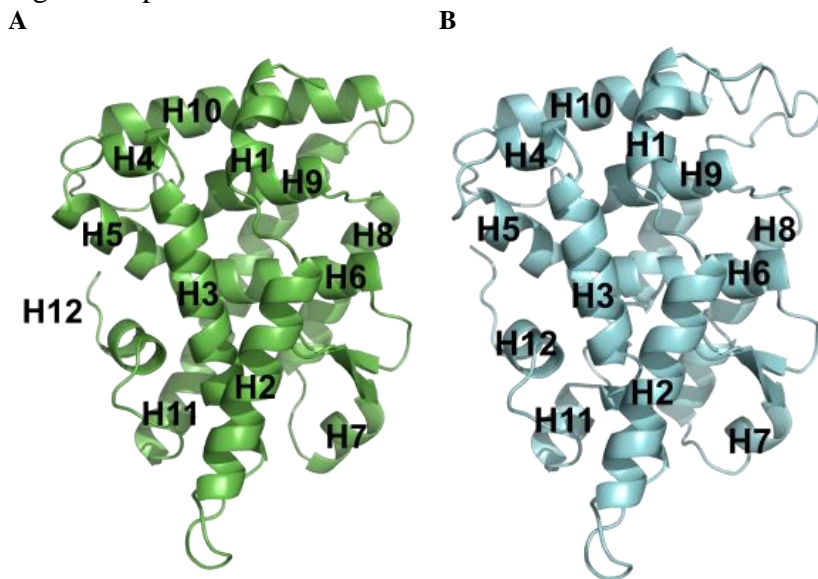
Fonte: Próprio autor

Devido à grande quantidade de receptores envolvidos neste estudo, serão apresentadas ainda nessa etapa de qualificação apenas dois modelos para avaliação e discussão, o modelo CgNR5A e modelo controle CgER. A identificação das regiões para os outros modelos encontra-se no APÊNDICE B.

Na Figura 5 é possível observar que o modelo CgN5A apresenta uma estrutura típica de NR, semelhante ao descrito por (LI; LAMBERT; XU, 2003), formada por 12  $\alpha$ -hélices mais duas folhas- $\beta$  em forma de grampo. As  $\alpha$ -hélices externas

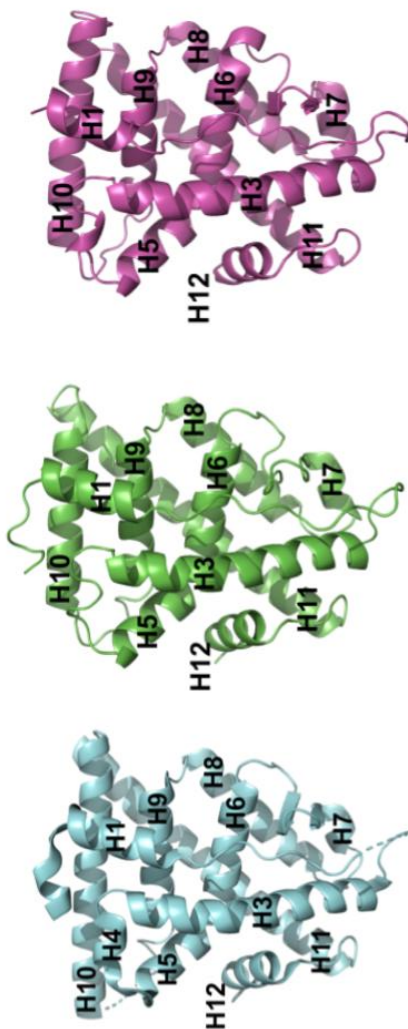
(H1, H3, H8 e H11) estão posicionadas ortogonalmente em relação às internas (H5, H6 e H9), em uma geometria semelhante a um “sanduíche” e dentro deste, encontrando-se o sítio de ligação. Apesar de o domínio LBD ser pouco conservado, a arquitetural geral entre os diferentes receptores é bastante similar e uma característica que os difere é a região que envolve as hélices H2, H3 e o grampo- $\beta$ . Nossas estruturas mostram que, enquanto alguns receptores apresentam um grande loop entre essas hélices, o modelo CgER (Figura 6) não possui este motivo, nem mesmo a hélice H2, estando em conformidade com esperado segundo literatura para estruturas de ER (ASCENZI; BOCEDI; MARINO, 2006), com a única diferença que o nosso modelo não apresenta a região de  $\alpha$ -hélice H4 bem definida. Contudo, quando observado o modelo experimental deste mesmo receptor em *C.gigas* descrito por (BRIDGHAM et al., 2014) o que se vê é que esta região também não é bem definida. Este resultado nos mostra, que apesar do modelo controle construído ter como base uma estrutura de ER humana, com sequência de identidade de 36% com *C. gigas*, a técnica de predição é capaz de chegar a um modelo tridimensional muito próximo ao já conhecido experimentalmente. Nesse sentido, essa última etapa de avaliação também é uma validação da técnica de modelagem comparativa.

**Figura 5** – Definição das regiões de  $\alpha$ -hélices e folhas- $\beta$  entre modelos. (A) Em verde CgNR5A com todas as 12  $\alpha$ -hélices bem definidas mais a região de grampo- $\beta$ . (B) Estrutura do cristal de 4ONI (HmNR5A) bem definidas sem ausência de regiões importantes no cristal.



Fonte: Próprio autor

**Figura 6** - Definição das regiões típicas de um Receptor Nuclear. Em verde o modelo de CgER com 10  $\alpha$ -hélices, ausência da região H2 e uma H4 não bem definida assim como a estrutura cristalográfica de CgER em roxo. Enquanto o modelo de ER-humano (azul) não apresenta apenas o motivo H2.



## 4.2 CARACTERIZAÇÃO DO SÍTIO DE LIGAÇÃO

Uma vez que os modelos gerados se mostraram promissores e confiáveis, após cinco etapas avaliações de qualidade, esperávamos que os volumes internos da cavidade de ligação, fossem muito próximos aos volumes descritos na literatura para receptores de mamíferos, já que nossos modelos em *C. gigas* se mostraram muito próximos, do ponto de vista estrutural, aos modelos encontrados nesses cristais.

Com o intuito de estabelecer um protocolo de caracterização das cavidades, assim como na etapa anterior de modelagem, utilizamos a estrutura de CgER como modelo controle e de ajuste de parâmetros. As estruturas de 4N1Y e 1GWR que já tem volumes descritos foram então submetidas ao programa CASTp, todavia, os valores encontrados não correspondem aos calculados por Bridgham et al. (2014), como mostra a Tabela 3.

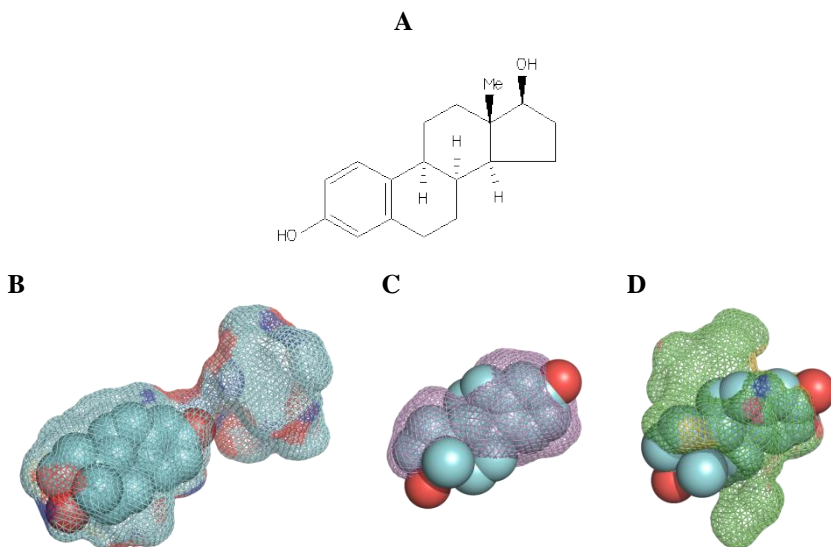
Várias tentativas de ajuste da área de superfície acessível ao solvente, *radius probe*, foram realizadas, sem sucesso. Tais divergências de valores se devem essencialmente pelo emprego de programas diferentes, com metodologias distintas para o cálculo de volume. Observamos na Figura 7, porém, que assim como o descrito por Bridgham e colaboradores, a cavidade encontrada pelo programa CASTp em ER de *C.gigas* ainda era proporcionalmente menor em relação ao volume da cavidade de ER em humano. E assim como é apontado por eles, a cavidade calculada é tão reduzida que não seria capaz de comportar um ligante como o estradiol.

**Tabela 3** – Quantificação dos volumes das cavidades para ER

	CASTp		(BRIDGHAM et al., 2014)
	Área (Å <sup>2</sup> )	Volume (Å <sup>3</sup> )	Volume (Å <sup>3</sup> )
CgNR3A	270,132	91,341	
4N1Y	157,573	78,744	168±8
1GWR	445,637	265,851	402

Fonte: Próprio autor

**Figura 7** – (A) Molécula de estradiol, ligante endógeno clássico de ER. (B) Superfície de volume de ER humano (1GWR) suficientemente grande para comportar o hormônio estradiol. Superfície de volume do cristal de CgER (C) e do modelo gerado (D) ambas não comportando adequadamente o estradiol.



Fonte: Próprio autor



Para fins comparativos, padronizamos a determinação dos volumes e resíduos que o compõem para um único programa, o CASTp. Sendo assim, todos os cristais e modelos tiveram seus valores determinados e estão disponíveis no APÊNDICE C.

Observamos também quais os resíduos que compõem a cavidade do sítio de ligação, como é apresentado na Figura 8A. Diferentemente de outros receptores de hormônios esteroides, não há densidade eletrônica, observada, de um ligante no interior da cavidade de ER de *C.gigas*. Ao invés disso, o que se encontram são cadeias laterais hidrofóbicas volumosas que ocupam ou até mesmo colidem com ligantes como o estradiol. Entre estes resíduos, se destacam para o cristal de *C.gigas*, Phe120, Phe208 e Phe209 (numeração orientada segundo alinhamento da Figura 8A (BRIDGHAM et al., 2014)). Nosso modelo aponta para a mesma colisão do resíduo Phe209 com o estradiol como mostra a Figura 8B, no entanto, apresenta também leves desvios na cadeia lateral que poderiam ser explicados pelo artefato da técnica de modelagem, uma vez que o modelo gerado em *C.gigas* foi guiado pela estrutura 1GWR. A acomodação da cadeia lateral poderia ser corrigida por simulações curtas de dinâmica molecular ou testes de *docking* molecular para cadeias flexíveis. É importante perceber que o desvio da cadeia lateral não é suficiente para gerar cavidades maiores, ao ponto de acomodar falsamente um ligante. Como observamos no nosso modelo de ER, a cavidade ainda é diminuta, colide o resíduo Phe209 com o estradiol e não é capaz de comportar o mesmo no sítio de ligação. Sendo assim, ainda poderíamos classificar as famílias em possivelmente moduladas ou não moduladas com base na capacidade de comportar ligantes.

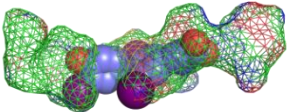
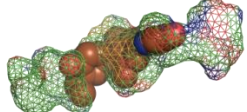
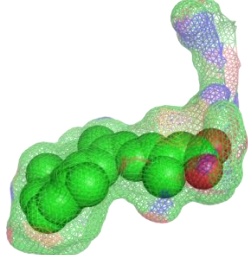
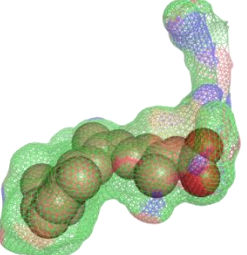
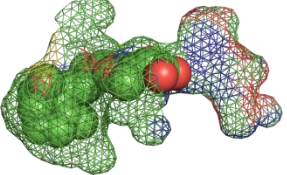
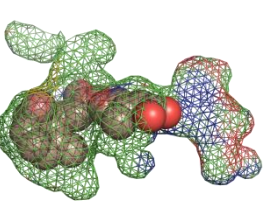
<i>1GWR</i> :A1-245	208	S H I R H M S N K M E F C Y S M K C K N V V P L Y D L L E M L D A H R L - - - - -	245
<i>4N1Y</i> :A1-240	196	T H I R Q A G E R G I A F F Q R L K S E G V V T F C D L K E M L D A Q D F L E K K S S N - -	240
<i>cGNR</i> A1-243	196	T H I R Q A G E R G I A F F Q R L K S E G V V T F C D L K E M D A Q D F L E K K S S N E G D	243

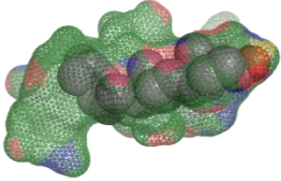
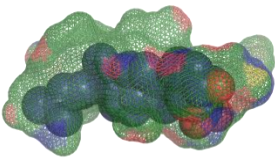
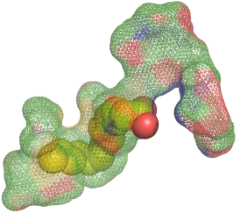
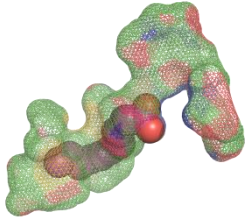
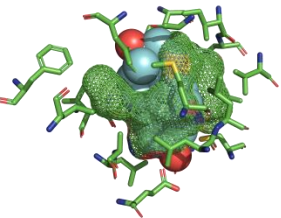
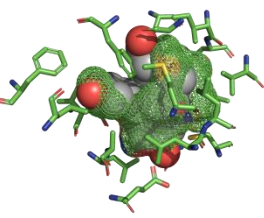
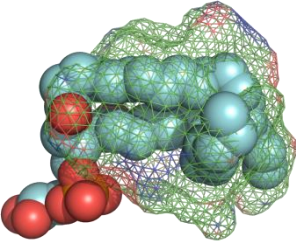
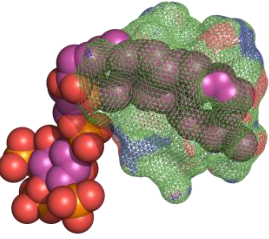
Fonte: Próprio autor

### 4.3 CLASSIFICAÇÃO: POTENCIALMENTE MODULADOS E NÃO MODULADOS.

No Quadro 1 é apresentada a classificação entre os membros potencialmente modulados e não modulados dos modelos de NRs em *C. gigas* com base na capacidade de comportar ligantes.

**Quadro 1** – Classificação geral entre potencialmente modulado (PM) e potencialmente não modulado (PNM). Para cada membro da superfamília são apresentadas as cavidades e seus ligantes com respectivos códigos de identificação.

NR	Possíveis ligantes		Classificação
CgTHR			PM
	T3	PFA	
CgRAR			PM
	9CR	REA	
CgRXR			PM
	9CR	REA	

CgROR	 <p>CLR</p>	 <p>4D8</p>	PM
CgHNF4	 <p>MYR</p>	 <p>DAO</p>	PM
CgER	 <p>EST</p>		PNM
CgNR5A	 <p>P6L</p>	 <p>PIZ</p>	PM

Fonte: Próprio autor

Uma extensa busca por ligantes para cada família de NR foi realizada no banco de dados de proteína e na literatura, a lista completa para cada uma delas encontra-se no APÊNDICE D. Em geral a maioria dos ligantes encontrados em cristais é de mamíferos, evidenciando mais uma vez a falta de estudos estruturais disponíveis para organismos não modelos.

### **4.3.1 THR**

Entre os ligantes endógenos encontrados, destacam-se os hormônios de 3,5,3'- triiodothyronine (T3) e 3,5,3',5'-tetraiodo-L-thyronine (T4). Para vertebrados tais hormônios tireoidianos desempenham papel fundamental na diferenciação, crescimento e metabolismo de todos os tecidos (YEN, 2001). A função de THR em invertebrados ainda é desconhecida, porém sabe-se que as iodotironinas, não são encontradas nesses organismos (HILL; WYSE; ANDERSON, 2012; WITHERS, 1992). Devido ao grande potencial farmacológico encontramos também vários fármacos tiromiméticos de ativação como PFA e 4HY. No Quadro 1 é possível observar que segundo nossos resultados tanto T3 quanto PFA se acomodam na cavidade proposta para o modelo de CgTHR, ainda que essa classe de hormônio não seja provável como ligante endógeno, pelos motivos citados acima.

### **4.3.2 RAR E RXR**

A vitamina A (retinol) é essencial em vários processos fisiológicos que incluem desde a diferenciação epitelial, crescimento ósseo normal, função reprodutiva (espermatogênese), manutenção da função imunológica e até mesmo o controle do desenvolvimento embrionário (ALLENBY et al., 1994; HILL; WYSE; ANDERSON, 2012). Já o ácido retinóico (REA) é um importante metabólito ativo que pode substituir o retinol em muitos dos seus efeitos

biológicos. A atividade do REA é mediada pelas famílias de RAR e RXR (ALLENBY et al., 1994; ROSS et al., 2000). Nosso levantamento de ligantes apontam este metabólito e o 9cis-ácido retinóico (9CR) como candidatos a ligantes endógenos em *C.gigas*. É possível observamos no Quadro 1 que ambos os ligantes são volumetricamente compatíveis, tanto com a cavidade de RAR quanto RXR. Estudos mostram que exposições a baixas concentrações de REA afetam a formação do olho de moluscos como *Lymnaea stagnalis*, *Physa fontinalis* e *Bithynia tentaculata*. Mais especificamente em *L. stagnalis* o ácido retinóico resulta em um espectro mais amplo de deficiências, incluindo defeitos oculares, desenvolvimento interrompido e deformações da concha (CRETON; ZWAAN; DOHMEN, 1993; ROSS et al., 2000). A exposição à REA em *Suberites domuncula* (porífero) também resulta em alterações citológicas e morfológicas (WIENS, 2003). Nesse sentido ambos os receptores poderiam ser classificados nessa análise como potencialmente modulados e seriam então, bons candidatos para estudo de *docking* molecular e interações com xenobióticos.

### 4.3.3 ROR

A cavidade proposta para o nosso modelo de ROR em *C.gigas*, apresenta grande volume. Dentro deste foi possível comportar ligantes volumosos como o colesterol e o inibidor 4D8. Estudos estruturais mostram que RORs tem cavidades de ligação relativamente grandes e que de fato se ligam a oxisteróis, vitaminas D e seus derivados, ácidos graxos e retinóides (SANTORI et al., 2015). Em humanos RORs tem como ligante natural o colesterol e o ácido retinóico (GERMAIN et al., 2004). Com base nestas informações é possível traçar para esse receptor um perfil de ligantes semelhantes ao colesterol, preferencialmente anfipáticos, com

anéis aromáticos e instaurações. Este receptor de *C. gigas* também é um bom candidato a estudos de interação molecular.

#### 4.3.4 NR2A-HNF4

A subfamília NR2A grupo contém os NRs mais antigos encontrados no reino animal e foram descobertos em metazoários simples como *Amphimedon queenslandica* (Porífera), *Trichoplax adhaerens* (Placozoa) e *Nematostella vectensis* (Cnidária) (BRIDGHAM et al., 2010). Apenas um único ortólogo é codificado em *Drosophila melanogaster* e esta envolvido no desenvolvimento do trato digestivo, mobilização e beta oxidação de lipídeos (PALANKER et al., 2009). Em humanos, tem tido especial atenção por desempenhar um papel significativo em doenças como diabetes e câncer de cólon (CHELLAPPA et al., 2012; LOVE-GREGORY; PERMUTT, 2007). Com relação a essa subfamília, classificamos em *C. gigas* como possivelmente modulada, uma vez que, se mostrou capaz de comportar os ácidos miristídico e láurico.

#### 4.3.5 NR5A

Nossos resultados apontam para uma cavidade relativamente grande para o modelo de NR5A em *C. gigas*. Trabalhos com essa subfamília em ratos mostraram que, mesmo na ausência de ligante ou peptídeo regulador a estrutura cristalizada de LRH-1 de *Mus musculus* (mLRH-1) mostrava-se ativa. Ao contrario de outros receptores órfãos, que não possuem uma bolsa de ligação ou estão ligados a um lipídio constitutivamente, o que se observa em mLRH-1 é que há uma grande cavidade desocupada (LI; LAMBERT; XU, 2003). Porém os estudos de (KRYLOVA et al., 2005) propõem que em humanos os membros da subfamília NR5A, se ligam ao fosfatidilinositol.

#### 4.4 POTENCIAL DE INTERAÇÃO NA CAVIDADE

Até agora nesse estudo vimos que é possível classificar a superfamília de NR de *C. gigas* em potencialmente modulados por ligantes e não modulados. Vimos também que é possível traçar um perfil de ligantes, para cada cavidade individualmente, com base nos volumes e dados da literatura. A fim de avaliar se estes receptores tem real potencial de interação com os ligantes apontados na seção anterior, realizamos testes de *docking* molecular e devido ao interesse ecotoxicológico inicial do trabalho, testamos também alguns fármacos de interesse ecotoxicológico. Entre os fármacos estão o Tamoxifeno (TAM), Paracetamol (PARA), Diclofenaco (DICL) e Ibuprofeno (IBU). A lista de ligantes testados com sua respectiva estrutura bidimensional encontra-se no APÊNDICE E e os resultados podem ser observados na Tabela 4.

**Tabela 4** - Valores de energia livre ( $\Delta G$ ) entre Receptores Nucleares de *C. gigas* e os diferentes ligantes.

NR	Possíveis ligantes		Fármacos			
	T3	T4	TAM	PARA	DICL	IBU
CgTHR	-6,3	-7,9	-9,5	-6,5	-8,3	-8,0
	<b>9CR</b>	<b>REA</b>				
CgRAR	-10,4	-11,4	-10,2	-6,3	-8,1	-9,8
	<b>4D8</b>	<b>CLR</b>				
CgROR	-13,3	-11,0	-10,7	-6,0	-9,1	-11,4
	<b>MYR</b>	<b>DAO</b>				
CgHNF4	-8,9	-7,6	-9,3	-6,2	-7,7	-7,2
	<b>9CR</b>	<b>REA</b>				
CgRXR	-9,8	-	-10,6	-6,3	-9,9	-8,3
	<b>P6L</b>	<b>PIZ</b>				
CgNR5A-NR5A	-6,6	-6,2	-8,5	-6,2	-7,5	-7,4

Fonte: Próprio autor



Os resultados de  $\Delta G$  mostram que em geral, todos os modelos propostos como modulados teriam o potencial de interação com os ligantes clássicos conhecidos e descritos em mamíferos. Na Tabela 5 temos os valores de  $\Delta G$  para os *redocks*, ou seja, os valores de energia livre para os mesmos ligantes nas estruturas dos cristais. Com estes valores é possível comparar se os nossos valores de  $\Delta G$  são condizentes com os valores encontrados em ligações estáveis. Considera-se que quanto menor o valor de energia livre, maior o potencial de interação entre duas moléculas. Nesse sentido destacam-se entre nossos modelos, os receptores de RAR e ROR que apresentam os menores valores de  $\Delta G$ , valores estes que são muito próximos dos observados nos *redocks* destes mesmos receptores em *Mus musculus* (1XDK) e humanos (4S15) respectivamente. Com exceção de CgTHR que apresenta os valores de  $\Delta G$  mais distantes em relação aos cristais e CgNR5A que não teve valor de *redock* calculado, em geral, todos os outros receptores de *C.gigas* apresentam potenciais de interação muito próximos ao encontrado em complexos estáveis.

**Tabela 5** – *Redocking*, valores de energia livre ( $\Delta G$ ) para os Receptores Nucleares dos cristais.

NR	PDB	Ligante	$\Delta G$
Hm-THR $\beta$	3GSW	T3	-11,8
Hm-THR $\beta$	2H77	T3	-10,3
Hm-THR $\beta$	1N46	PFA	-11,7
Mus musculus-RAR $\beta$	1XDK	9CR	-10,2
Hm-ROR $\alpha$	4S15	4D8	-13,3
Hm-HNF4 $\alpha$	4IQR	MYR	-5,5
Biomphalaria glabrata-RXR	1XIU	9CR	-9,6

Fonte: Próprio autor

Já em relação aos fármacos, da mesma forma, percebe-se que o TAM tem considerável potencial de interação com todos os receptores testados e o paracetamol menor potencial de

ligação. Estes dados indicam que dentre os fármacos, o TAM é o que apresenta maior chance de interação com estes receptores estudados. Apesar de não haver relatos no Brasil, diversos estudos já evidenciaram a presença do TAM no ambiente aquático, sendo encontrado em concentrações ambientais de até 212 ng.L<sup>-1</sup> e em efluentes domésticos de até 740 ng.L<sup>-1</sup> (ASHTON; HILTON; THOMAS, 2004; COETSIER et al., 2009; NEGREIRA et al., 2013; ROBERTS; THOMAS, 2006). Apesar da sua ampla utilização no tratamento ao câncer de mama, estudos já reconheceram o potencial carcinogênico do TAM em ratos (FENDL; ZIMNISKI, 1992; RUTQVIST et al., 1995) e em humanos (MANI; KUPFER, 1991). Em peixes, foram observadas alterações na capacidade reprodutiva, nos níveis de vitelogenina, na histologia e no tamanho corporal (SUN et al., 2007). Já em crustáceos, foi observada inibição no desenvolvimento naupliar (ANDERSEN et al., 2001).

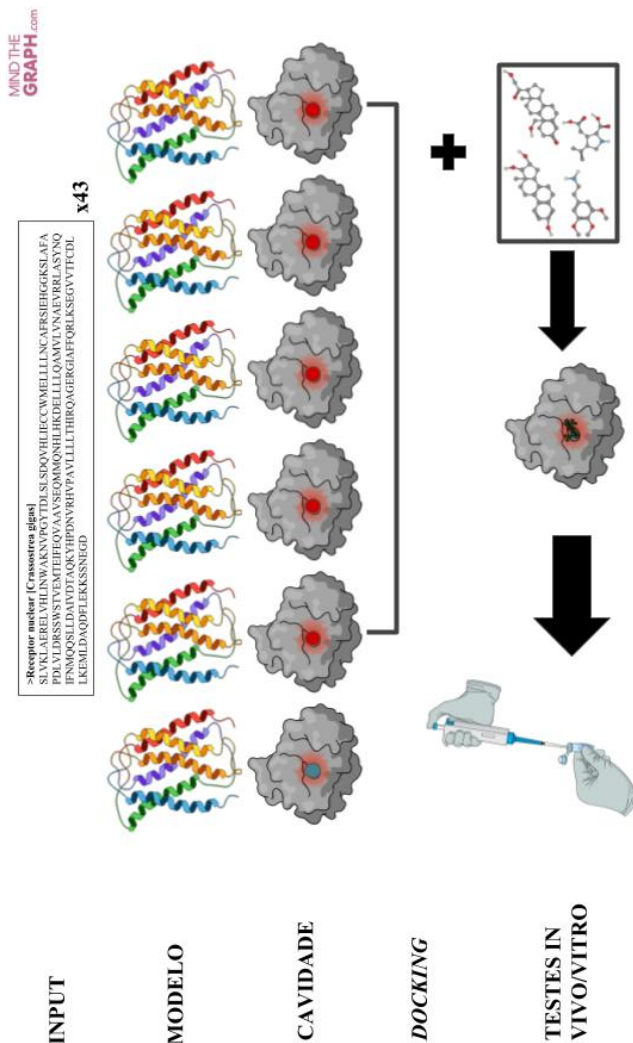
## 5 CONCLUSÃO

Apresentamos neste estudo uma abordagem que se mostrou promissora para caracterização da superfamília de receptores nucleares em um organismo não modelo. As técnicas de modelagem comparativa e caracterização de cavidades foram capazes de traçar um perfil estrutural para cada membro estudado classificando-os em potencialmente modulados e não modulados. Fomos capazes também de traçar um perfil de ligantes para cada cavidade, direcionando assim testes de *docking* molecular com ligantes endógenos de mamíferos e fármacos xenobióticos. Encontramos semelhanças nos potenciais energéticos de ligação de CgRAR, CgRXR e CgROR com ligantes endógenos de vertebrados como REA e 9CR. Em especial, CgROR se mostrou favorável a interações com colesterol e tamoxifeno.

### 5.1 PERSPECTIVAS

A metodologia proposta e desenvolvida no presente trabalho, por se mostrar promissora para caracterização de uma superfamília inteira, poderia ser empregada em estudos que busquem informações estruturais e filtros para testes direcionados em laboratório. Nesse sentido consideramos possível, através dos protocolos desenvolvidos, a construção de uma ferramenta online, como mostra a Figura 9, automatizando todo o processo de caracterização estrutural de proteínas.

**Figura 9** – Esquema de uma possível ferramenta online para caracterização estrutural de toda uma superfamília de proteínas, direcionando testes em bancada através de várias etapas de filtros.



## REFERÊNCIAS

ALLENBY, G. et al. Binding of 9-cis-retinoic acid and all-trans-retinoic acid to retinoic acid receptors alpha, beta, and gamma. Retinoic acid receptor gamma binds all-trans-retinoic acid preferentially over 9-cis-retinoic acid. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 24, p. 16689–16695, 1994.

ALONSO, H.; BLIZNYUK, A. A.; GREASY, J. E. Combining docking and molecular dynamic simulations in drug design. **Medicinal research reviews**, v. 26, n. 5, p. 531–568, 2006.

ANDERSEN, H. R. et al. Development of copepod nauplii to copepodites—a parameter for chronic toxicity including endocrine disruption. **Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal**, v. 20, n. 12, p. 2821–2829, 2001.

ASCENZI, P.; BOCEDI, A.; MARINO, M. Structure–function relationship of estrogen receptor  $\alpha$  and  $\beta$ : impact on human health. **Molecular aspects of medicine**, v. 27, n. 4, p. 299–402, 2006.

ASHTON, D.; HILTON, M.; THOMAS, K. V. Investigating the environmental transport of human pharmaceuticals to streams in the United Kingdom. **Science of the Total Environment**, v. 333, n. 1–3, p. 167–184, 2004.

BENKERT, P.; BIASINI, M.; SCHWEDE, T. Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models. **Bioinformatics**, v. 27, n. 3, p. 343–350, 1 fev. 2011.

BERMAN, H. M. et al. The Protein Data Bank. **Nucleic Acids Research**, v. 28, n. 1, p. 235–242, 1 jan. 2000.

BERTONI, M. et al. Modeling protein quaternary structure of homo- and hetero-oligomers beyond binary interactions by homology. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, dez. 2017.

BIENERT, S. et al. The SWISS-MODEL Repository—new features and functionality. **Nucleic Acids Research**, v. 45, n. D1, p. D313–D319, 4 jan. 2017.

BLEICHER, L. et al. Structural basis of GC-1 selectivity for thyroid hormone receptor isoforms. **BMC Structural Biology**, v. 8, n. 1, p. 8, 2008.

BOURGUET, W. et al. Crystal structure of a heterodimeric complex of RAR and RXR ligand-binding domains. **Molecular Cell**, v. 5, n. 2, p. 289–298, fev. 2000.

BRIDGHAM, J. T. et al. Protein Evolution by Molecular Tinkering: Diversification of the Nuclear Receptor Superfamily from a Ligand-Dependent Ancestor. **PLoS Biology**, v. 8, n. 10, p. e1000497, 5 out. 2010.

BRIDGHAM, J. T. et al. Vestigialization of an allosteric switch: genetic and structural mechanisms for the evolution of constitutive activity in a steroid hormone receptor. **PLoS genetics**, v. 10, n. 1, p. e1004058, 2014.

CAJARAVILLE, M. P. et al. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. **Science of The Total Environment**, v. 247, n. 2, p. 295–311, 20 mar. 2000.

CAMACHO, C. et al. BLAST+: architecture and applications. **BMC Bioinformatics**, v. 10, n. 1, p. 421, 2009.

CANELA, M. C. et al. Caféina em águas de abastecimento público no Brasil. **Instituto Nacional de Ciências e**

**Tecnologias Analíticas Avançadas–INCTAA, Editora Cubo, São Carlos, 96p, 2014.**

CHANDRA, V. et al. Multidomain integration in the structure of the HNF-4 $\alpha$  nuclear receptor complex. **Nature**, v. 495, n. 7441, p. 394–398, mar. 2013.

CHELLAPPA, K. et al. Src tyrosine kinase phosphorylation of nuclear receptor HNF4 correlates with isoform-specific loss of HNF4 in human colon cancer. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 7, p. 2302–2307, 14 fev. 2012.

CHIMERA, U. a visualization system for exploratory research and analysis. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, Ferrin TE. **J Comput Chem**, v. 25, n. 13, p. 1605–12, 2004.

COETSIER, C. M. et al. Discharge of pharmaceutical products (PPs) through a conventional biological sewage treatment plant: MECs vs PECs? **Environment International**, v. 35, n. 5, p. 787–792, 2009.

COLLIN, H. et al. Response of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*, Thunberg 1793, to pesticide exposure under experimental conditions. **Journal of Experimental Biology**, v. 213, n. 23, p. 4010–4017, 1 dez. 2010.

Contaminação emergente | Revista Pesquisa Fapesp. [s.d.].

CRETON, R.; ZWAAN, G.; DOHMEN, R. Specific Developmental Defects in Molluscs after Treatment with Retinoic Acid during Gastrulation. (retinoic acid/molluscs/gastrulation/morphogenesis/eye development). **Development, Growth and Differentiation**, v. 35, n. 3, p. 357–364, jun. 1993.

DE GROOT, A. et al. Crystal Structure of a Novel Tetrameric Complex of Agonist-bound Ligand-binding Domain of Biomphalaria glabrata Retinoid X Receptor. **Journal of Molecular Biology**, v. 354, n. 4, p. 841–853, dez. 2005.

DHE-PAGANON, S. et al. Crystal Structure of the HNF4 $\alpha$  Ligand Binding Domain in Complex with Endogenous Fatty Acid Ligand. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 41, p. 37973–37976, 11 out. 2002.

DOKIANAKIS, S. N.; KORNAROS, M. E.; LYBERATOS, G. On the effect of pharmaceuticals on bacterial nitrite oxidation. **Water Science and Technology**, v. 50, n. 5, p. 341–346, 2004.

DOW, R. L. et al. Discovery of a novel series of 6-azauracil-based thyroid hormone receptor ligands: potent, TR beta subtype-selective thyromimetics. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 13, n. 3, p. 379–382, 10 fev. 2003.

DUDA, K.; CHI, Y.-I.; SHOELSON, S. E. Structural Basis for HNF-4 $\alpha$  Activation by Ligand and Coactivator Binding. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 22, p. 23311–23316, 28 maio 2004.

DUSSAULT, E. B. et al. Toxicity of human pharmaceuticals and personal care products to benthic invertebrates. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 27, n. 2, p. 425–432, 2008.

EGEA, P. F.; MITSCHLER, A.; MORAS, D. Molecular Recognition of Agonist Ligands by RXRs. **Molecular Endocrinology**, v. 16, n. 5, p. 987–997, maio 2002.

ERNANDE, B. et al. Plasticity in resource allocation based life history traits in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. I. Spatial variation in food abundance: Plasticity in resource allocation in



a marine bivalve. **Journal of Evolutionary Biology**, v. 17, n. 2, p. 342–356, 23 dez. 2003.

EVERS, A.; GOHLKE, H.; KLEBE, G. Ligand-supported homology modelling of protein binding-sites using knowledge-based potentials. **Journal of molecular biology**, v. 334, n. 2, p. 327–345, 2003.

FAUBER, B. P. et al. Reduction in lipophilicity improved the solubility, plasma–protein binding, and permeability of tertiary sulfonamide ROR $\alpha$  inverse agonists. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 24, n. 16, p. 3891–3897, ago. 2014.

FENDL, K. C.; ZIMNISKI, S. J. Role of tamoxifen in the induction of hormone-independent rat mammary tumors. **Cancer research**, v. 52, n. 1, p. 235–237, 1992.

FOALE, S. An evaluation of the potential of gastropod imposex as a bioindicator of tributyltin pollution in Port Phillip Bay, Victoria. **Marine Pollution Bulletin**, v. 26, n. 10, p. 546–552, out. 1993.

FRICKER, P. C.; GASTREICH, M.; RAREY, M. Automated drawing of structural molecular formulas under constraints. **Journal of chemical information and computer sciences**, v. 44, n. 3, p. 1065–1078, 2004.

FUJITA-SATO, S. et al. Structural Basis of Digoxin That Antagonizes ROR $\gamma$  Receptor Activity and Suppresses Th17 Cell Differentiation and Interleukin (IL)-17 Production. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 36, p. 31409–31417, 9 set. 2011.

GERMAIN, P. et al. Rational design of RAR-selective ligands revealed by RAR $\beta$  crystal structure. **EMBO reports**, v. 5, n. 9, p. 877–882, set. 2004.

GUEGUEN, Y. et al. Characterization of a Defensin from the Oyster *Crassostrea gigas*: *RECOMBINANT PRODUCTION, FOLDING, SOLUTION STRUCTURE, ANTIMICROBIAL ACTIVITIES, AND GENE EXPRESSION*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 1, p. 313–323, 6 jan. 2006.

GUDEX, N.; PEITSCH, M. C.; SCHWEDE, T. Automated comparative protein structure modeling with SWISS-MODEL and Swiss-PdbViewer: A historical perspective. **ELECTROPHORESIS**, v. 30, n. S1, p. S162–S173, jun. 2009.

HANDSCHIN, C.; MEYER, A. Induction of Drug Metabolism: The Role of Nuclear Receptors. **Pharmacological Reviews**, v. 55, n. 4, p. 649–673, 1 dez. 2003.

HENZLER-WILDMAN, K.; KERN, D. Dynamic personalities of proteins. **Nature**, v. 450, n. 7172, p. 964–972, 2007.

HERNANDO, M. et al. Environmental risk assessment of pharmaceutical residues in wastewater effluents, surface waters and sediments. **Talanta**, v. 69, n. 2, p. 334–342, 2006.

HILL, R. W.; WYSE, A.; ANDERSON, M. Fisiologia animal 2. ed. **Porto Alegre: Artmed**, 2012.

HIRATA, K. et al. SAR Exploration Guided by LE and Fsp<sup>3</sup>: Discovery of a Selective and Orally Efficacious ROR $\gamma$  Inhibitor. **ACS Medicinal Chemistry Letters**, v. 7, n. 1, p. 23–27, 14 jan. 2016.

HÖLTJE, H. D. et al. Introduction to comparative protein modeling. **Molecular Modeling: Basic Principles and Applications**, 2003.

HUGGETT, D. B. et al. A theoretical model for utilizing mammalian pharmacology and safety data to prioritize potential impacts of human pharmaceuticals to fish. **Human and Ecological Risk Assessment**, v. 9, n. 7, p. 1789–1799, 2003.

HUGHES, N. E. et al. Identification of potent and selective retinoic acid receptor gamma (RAR $\gamma$ ) antagonists for the treatment of osteoarthritis pain using structure based drug design. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 26, n. 14, p. 3274–3277, jul. 2016.

IRWIN, J. J. et al. ZINC: A Free Tool to Discover Chemistry for Biology. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 52, n. 7, p. 1757–1768, 23 jul. 2012.

IWEMA, T. et al. Structural and functional characterization of a novel type of ligand-independent RXR-USP receptor. **The EMBO Journal**, v. 26, n. 16, p. 3770–3782, 22 ago. 2007.

JAYE, M. C. et al. Discovery of Substituted Maleimides as Liver X Receptor Agonists and Determination of a Ligand-Bound Crystal Structure. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 48, n. 17, p. 5419–5422, ago. 2005.

JIANG, S. et al. DM9 Domain Containing Protein Functions As a Pattern Recognition Receptor with Broad Microbial Recognition Spectrum. **Frontiers in Immunology**, v. 8, 29 nov. 2017.

JOURAVEL, N. et al. Molecular basis for dimer formation of TR $\beta$  variant D355R. **Proteins**, v. 75, n. 1, p. 111–117, abr. 2009.

KALLEN, J. A. et al. X-ray structure of the hROR $\alpha$  LBD at 1.63 Å: structural and functional data that cholesterol or a

cholesterol derivative is the natural ligand of ROR $\alpha$ . **Structure (London, England: 1993)**, v. 10, n. 12, p. 1697–1707, dez. 2002.

KICK, E. K. et al. Discovery of Highly Potent Liver X Receptor  $\beta$  Agonists. **ACS Medicinal Chemistry Letters**, v. 7, n. 12, p. 1207–1212, 8 dez. 2016.

KIM, Y. et al. Aquatic toxicity of acetaminophen, carbamazepine, cimetidine, diltiazem and six major sulfonamides, and their potential ecological risks in Korea. **Environment International**, v. 33, n. 3, p. 370–375, 2007.

KLAHOLZ, B. P. et al. Conformational adaptation of agonists to the human nuclear receptor RAR  $\gamma$ . **Nature Structural Biology**, v. 5, n. 3, p. 199–202, mar. 1998.

KOLPIN, D. W. et al. Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in US streams, 1999– 2000: A national reconnaissance. **Environmental science & technology**, v. 36, n. 6, p. 1202–1211, 2002.

KRYLOVA, I. N. et al. Structural analyses reveal phosphatidyl inositols as ligands for the NR5 orphan receptors SF-1 and LRH-1. **Cell**, v. 120, n. 3, p. 343–355, 2005.

LAM, P. K. .; GRAY, J. S. The use of biomarkers in environmental monitoring programmes. **Marine Pollution Bulletin**, v. 46, n. 2, p. 182–186, fev. 2003.

LANGFORD, K. H.; THOMAS, K. V. Determination of pharmaceutical compounds in hospital effluents and their contribution to wastewater treatment works. **Environment International**, v. 35, n. 5, p. 766–770, 2009.

LARKIN, M. A. et al. Clustal W and Clustal X version 2.0. **Bioinformatics**, v. 23, n. 21, p. 2947–2948, 1 nov. 2007.

LE MAIRE, A. et al. A unique secondary-structure switch controls constitutive gene repression by retinoic acid receptor. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 17, n. 7, p. 801–807, jul. 2010.

LI, L. et al. Divergence and plasticity shape adaptive potential of the Pacific oyster. **Nature Ecology & Evolution**, 24 set. 2018.

LI, Y.; LAMBERT, M. H.; XU, H. E. Activation of Nuclear Receptors. **Structure**, v. 11, n. 7, p. 741–746, jul. 2003.

LOU, X. et al. Structure of the retinoid X receptor  $\alpha$ –liver X receptor  $\beta$  (RXR $\alpha$ –LXR $\beta$ ) heterodimer on DNA. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 21, n. 3, p. 277–281, mar. 2014.

LOVE-GREGORY, L.; PERMUTT, M. A. HNF4A genetic variants: role in diabetes: **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v. 10, n. 4, p. 397–402, jul. 2007.

LOVELL, S. C. et al. Structure validation by C $\alpha$  geometry:  $\phi, \psi$  and C $\beta$  deviation. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 50, n. 3, p. 437–450, 8 jan. 2003.

MANI, C.; KUPFER, D. Cytochrome P-450-mediated activation and irreversible binding of the antiestrogen tamoxifen to proteins in rat and human liver: possible involvement of flavin-containing monooxygenases in tamoxifen activation. **Cancer research**, v. 51, n. 22, p. 6052–6058, 1991.

MAYS, S. G. et al. Crystal Structures of the Nuclear Receptor, Liver Receptor Homolog 1, Bound to Synthetic Agonists. **Journal of Biological Chemistry**, v. 291, n. 49, p. 25281–25291, 2 dez. 2016.

MAYS, S. G. et al. Structure and Dynamics of the Liver Receptor Homolog 1–PGC1  $\alpha$  Complex. **Molecular Pharmacology**, v. 92, n. 1, p. 1–11, jul. 2017.

MCEWAN, I. J. Nuclear Receptors: One Big Family. In: MCEWAN, I. J. (Ed.). . **The Nuclear Receptor Superfamily**. Totowa, NJ: Humana Press, 2009. v. 505p. 3–18.

MI, L.-Z. et al. Structural basis for bile acid binding and activation of the nuclear receptor FXR. **Molecular Cell**, v. 11, n. 4, p. 1093–1100, abr. 2003.

MIOSSEC, L.; LE DEUFF, R.-M.; GOULLETQUER, P. **Alien species alert: Crassostrea gigas (Pacific oyster)**. Copenhagen: Internat. Council for the Exploration of the Sea, 2009.

MUSILLE, P. M. et al. Antidiabetic phospholipid–nuclear receptor complex reveals the mechanism for phospholipid-driven gene regulation. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 19, n. 5, p. 532–537, maio 2012.

MUSILLE, P. M. et al. Unexpected Allosteric Network Contributes to LRH-1 Co-regulator Selectivity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 291, n. 3, p. 1411–1426, 15 jan. 2016.

NAHOUM, V. et al. Modulators of the structural dynamics of the retinoid X receptor to reveal receptor function. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 44, p. 17323–17328, 30 out. 2007.

NASCIMENTO, A. S. et al. Structural Rearrangements in the Thyroid Hormone Receptor Hinge Domain and Their Putative Role in the Receptor Function. **Journal of Molecular Biology**, v. 360, n. 3, p. 586–598, jul. 2006.

NEGREIRA, N. et al. Multianalyte determination of 24 cytostatics and metabolites by liquid chromatography–electrospray–tandem mass spectrometry and study of their stability and optimum storage conditions in aqueous solution. **Talanta**, v. 116, p. 290–299, 2013.

NIKOLAOU, A.; MERIC, S.; FATTA, D. Occurrence patterns of pharmaceuticals in water and wastewater environments. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 387, n. 4, p. 1225–1234, 2007.

NOGUCHI, M. et al. Ternary complex of human ROR $\gamma$  ligand-binding domain, inverse agonist and SMRT peptide shows a unique mechanism of corepressor recruitment. **Genes to Cells**, v. 22, n. 6, p. 535–551, jun. 2017.

ORTLUND, E. A. et al. Modulation of human nuclear receptor LRH-1 activity by phospholipids and SHP. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 12, n. 4, p. 357–363, abr. 2005.

PALANKER, L. et al. Drosophila HNF4 regulates lipid mobilization and  $\beta$ -oxidation. **Cell metabolism**, v. 9, n. 3, p. 228–239, 2009.

PARK, H.; LEE, S. Homology modeling, force field design, and free energy simulation studies to optimize the activities of histone deacetylase inhibitors. **Journal of computer-aided molecular design**, v. 18, n. 6, p. 375–388, 2004.

POGENBERG, V. et al. Characterization of the Interaction between Retinoic Acid Receptor/Retinoid X Receptor

(RAR/RXR) Heterodimers and Transcriptional Coactivators through Structural and Fluorescence Anisotropy Studies. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 2, p. 1625–1633, 14 jan. 2005.

RENAUD, J.-P. et al. Crystal structure of the RAR- $\gamma$  ligand-binding domain bound to all-trans retinoic acid. **Nature**, v. 378, n. 6558, p. 681–689, dez. 1995.

RHA, G. B. et al. Multiple Binding Modes between HNF4 $\alpha$  and the L XX LL Motifs of PGC-1 $\alpha$  Lead to Full Activation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 50, p. 35165–35176, 11 dez. 2009.

ROBERTS, P. H.; THOMAS, K. V. The occurrence of selected pharmaceuticals in wastewater effluent and surface waters of the lower Tyne catchment. **Science of the Total Environment**, v. 356, n. 1–3, p. 143–153, 2006.

RODRIGUES, P. et al. Urogenital papilla feminization in male *Pomatoschistus minutus* from two estuaries in northwestern Iberian Peninsula. **Marine Environmental Research**, v. 62 Suppl, p. S258-262, jul. 2006.

ROSS, S. A. et al. Retinoids in Embryonal Development. **Physiological Reviews**, v. 80, n. 3, p. 1021–1054, jul. 2000.

RUTQVIST, L. E. et al. Adjuvant tamoxifen therapy for early stage breast cancer and second primary malignancies. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, v. 87, n. 9, p. 645–651, 1995.

SANTORI, F. R. et al. Identification of natural ROR $\gamma$  ligands that regulate the development of lymphoid cells. **Cell metabolism**, v. 21, n. 2, p. 286–297, 2015.



SANTOS, M. M. et al. Identifying the gaps: Resources and perspectives on the use of nuclear receptor based-assays to improve hazard assessment of emerging contaminants. **Journal of Hazardous Materials**, v. 358, p. 508–511, set. 2018.

SATO, Y. et al. The “Phantom Effect” of the Reginoid LG100754: Structural and Functional Insights. **PLoS ONE**, v. 5, n. 11, p. e15119, 30 nov. 2010.

SAVAS, Ü.; GRIFFIN, K. J.; JOHNSON, E. F. Molecular Mechanisms of Cytochrome P-450 Induction by Xenobiotics: An Expanded Role for Nuclear Hormone Receptors. **Molecular Pharmacology**, v. 56, n. 5, p. 851–857, 1 nov. 1999.

SCHEEPSTRA, M. et al. Identification of an allosteric binding site for ROR $\gamma$ t inhibition. **Nature Communications**, v. 6, n. 1, dez. 2015.

SCHRÖDINGER, L. L. C. The PyMOL molecular graphics system, Version 1.8. 2015. **Google Scholar**, 2017.

SOUZA, P. C. T. et al. Identification of a New Hormone-Binding Site on the Surface of Thyroid Hormone Receptor. **Molecular Endocrinology**, v. 28, n. 4, p. 534–545, abr. 2014.

STEHLIN, C. et al. X-ray structure of the orphan nuclear receptor ROR $\beta$  ligand-binding domain in the active conformation. **The EMBO journal**, v. 20, n. 21, p. 5822–5831, 1 nov. 2001.

STIERAND, K.; MAAß, P. C.; RAREY, M. Molecular complexes at a glance: automated generation of two-dimensional complex diagrams. **Bioinformatics**, v. 22, n. 14, p. 1710–1716, 2006.

SUINO, K. et al. The Nuclear Xenobiotic Receptor CAR. **Molecular Cell**, v. 16, n. 6, p. 893–905, dez. 2004.

SUN, L. et al. Tamoxifen effects on the early life stages and reproduction of Japanese medaka (*Oryzias latipes*). **Environmental toxicology and pharmacology**, v. 24, n. 1, p. 23–29, 2007.

SVENSSON, S. Crystal structure of the heterodimeric complex of LXR and RXR ligand-binding domains in a fully agonistic conformation. **The EMBO Journal**, v. 22, n. 18, p. 4625–4633, 15 set. 2003.

THOMASIDIS, N. S.; ASIMAKOPOULOS, A. G.; BLETSOU, A. A. Emerging contaminants: a tutorial mini-review. **Global NEST Journal**, v. 14, n. 1, p. 72–79, 2012.

TIAN, W. et al. CASTp 3.0: computed atlas of surface topography of proteins. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. W1, p. W363–W367, 2 jul. 2018.

TICE, C. M. et al. Brain penetrant liver X receptor (LXR) modulators based on a 2,4,5,6-tetrahydropyrrolo[3,4-c]pyrazole core. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 26, n. 20, p. 5044–5050, out. 2016.

TROTT, O.; OLSON, A. J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. **Journal of computational chemistry**, v. 31, n. 2, p. 455–461, 2010.

UNNO, H. et al. Identification, Characterization and X-ray Crystallographic Analysis of a Novel Type of Mannose-Specific Lectin CGL1 from the Pacific Oyster *Crassostrea gigas*. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, set. 2016.

VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N. P. . Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 13, n. 2, p. 57–149, fev. 2003.

VIARENGO, A. et al. The use of biomarkers in biomonitoring: A 2-tier approach assessing the level of pollutant-induced stress syndrome in sentinel organisms. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 146, n. 3, p. 281–300, set. 2007.

VOGELER, S. et al. The nuclear receptor gene family in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, contains a novel subfamily group. **BMC Genomics**, v. 15, n. 1, p. 369, 2014.

WALKER, S. D.; MCELDFOWNEY, S. Molecular docking: A potential tool to aid ecotoxicity testing in environmental risk assessment of pharmaceuticals. **Chemosphere**, v. 93, n. 10, p. 2568–2577, 1 nov. 2013.

WANG, T. et al. Discovery of novel pyrazole-containing benzamides as potent ROR $\gamma$  inverse agonists. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 25, n. 15, p. 2985–2990, ago. 2015.

WATERHOUSE, A. et al. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. W1, p. W296–W303, 2 jul. 2018.

WESSEL, N. et al. Investigating the relationship between embryotoxic and genotoxic effects of benzo[a]pyrene, 17 $\alpha$ -ethinylestradiol and endosulfan on *Crassostrea gigas* embryos. **Aquatic Toxicology**, v. 85, n. 2, p. 133–142, nov. 2007.

WIENS, M. Retinoid X receptor and retinoic acid response in the marine sponge *Suberites domuncula*. **Journal of**

**Experimental Biology**, v. 206, n. 18, p. 3261–3271, 15 set. 2003.

WITHERS, P. C. **Comparative animal physiology**. Fort Worth: Saunders College Pub, 1992.

XIE, W. et al. Reciprocal activation of Xenobiotic response genes by nuclear receptors SXR/PXR and CAR. **Genes & Development**, v. 14, n. 23, p. 3014–3023, 12 jan. 2000.

XIE, W.; EVANS, R. M. Orphan Nuclear Receptors: The Exotics of Xenobiotics. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 41, p. 37739–37742, 10 dez. 2001.

XU, J.; ZHANG, Y. How significant is a protein structure similarity with TM-score = 0.5? **Bioinformatics**, v. 26, n. 7, p. 889–895, 1 abr. 2010.

XU, R. X. et al. A Structural Basis for Constitutive Activity in the Human CAR/RXR $\alpha$  Heterodimer. **Molecular Cell**, v. 16, n. 6, p. 919–928, dez. 2004.

YANG, T. et al. Discovery of tertiary amine and indole derivatives as potent ROR $\gamma$ t inverse agonists. **ACS medicinal chemistry letters**, v. 5, n. 1, p. 65–68, 2013.

YANG, W. et al. Molecular docking and comparative molecular similarity indices analysis of estrogenicity of polybrominated diphenyl ethers and their analogues. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 29, n. 3, p. 660–668, 1 mar. 2010.

YEN, P. M. Physiological and Molecular Basis of Thyroid Hormone Action. **Physiological Reviews**, v. 81, n. 3, p. 1097–1142, jul. 2001.

YOO, S. Energy landscapes: Application to silicon nanoclusters and protein stabilities. 2004.

YUAN, X. et al. Identification of an Endogenous Ligand Bound to a Native Orphan Nuclear Receptor. **PLoS ONE**, v. 4, n. 5, p. e5609, 19 maio 2009.

YUMOTO, F. et al. Structural basis of coactivation of liver receptor homolog-1 by  $\beta$ -catenin. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 1, p. 143–148, 3 jan. 2012.

ZHANG, G. et al. The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation. **Nature**, v. 490, n. 7418, p. 49–54, 19 set. 2012.

ZHANG, Y.; SKOLNICK, J. Scoring function for automated assessment of protein structure template quality. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 57, n. 4, p. 702–710, 2004.

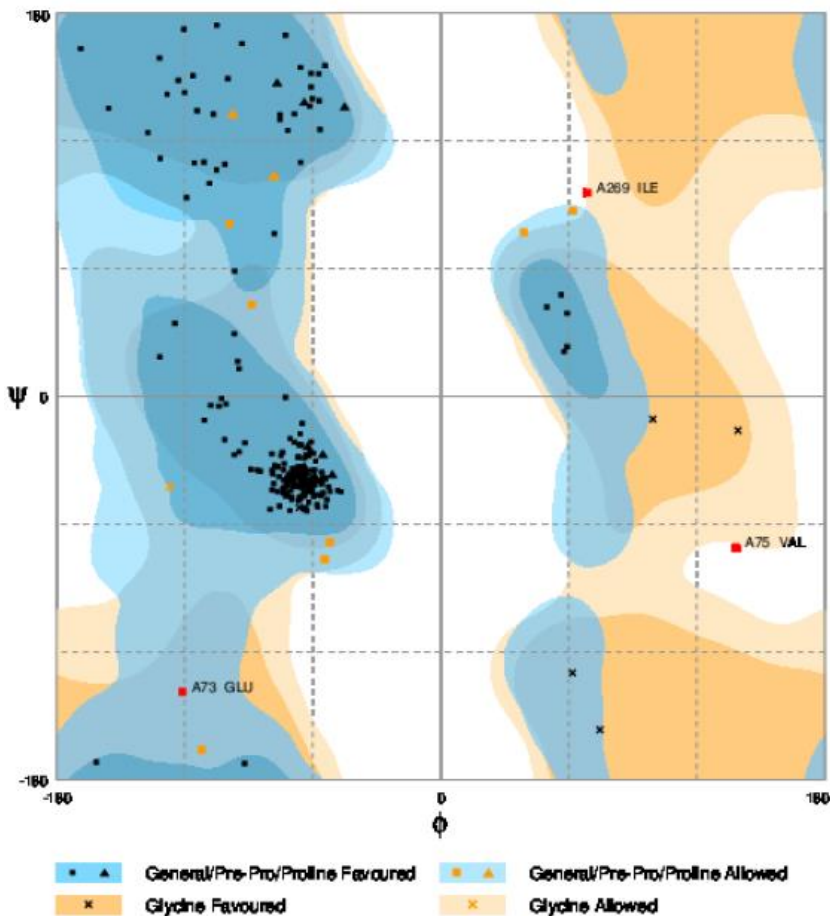
ZHOU, Y. et al. The discovery of novel and selective fatty acid binding protein 4 inhibitors by virtual screening and biological evaluation. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 24, n. 18, p. 4310–4317, 15 set. 2016.

ZUERCHER, W. J. et al. Discovery of Tertiary Sulfonamides as Potent Liver X Receptor Antagonists. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 53, n. 8, p. 3412–3416, 22 abr. 2010.



## APÊNDICE A – Gráficos de Ramachandran para os diferentes Receptores Nucleares.

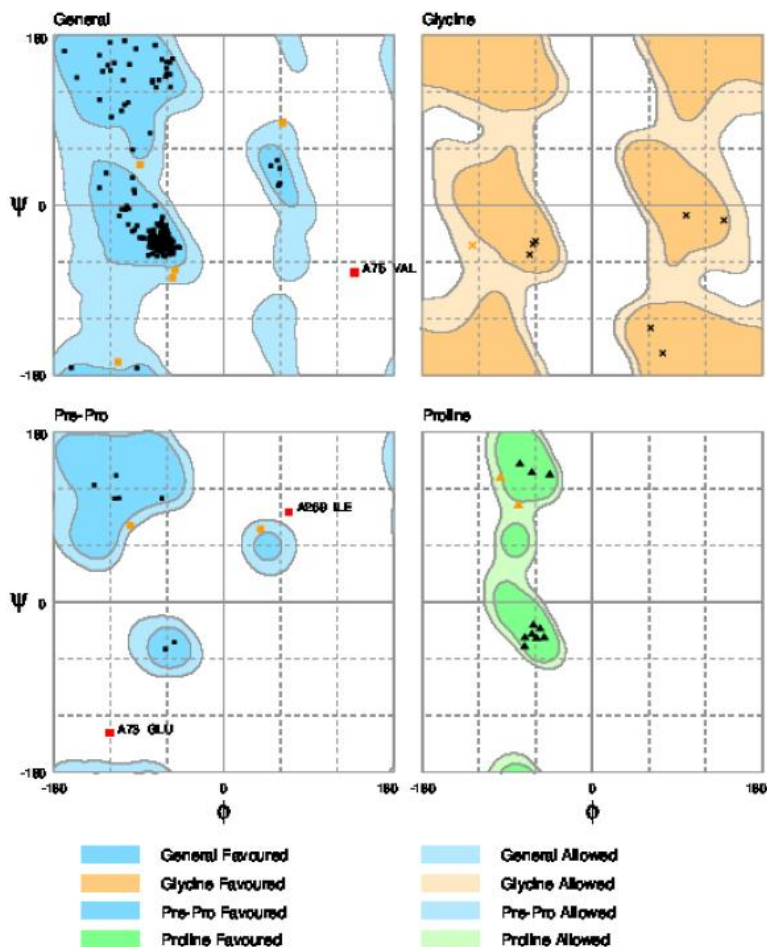
### CgNR1A-THR



Number of residues in favoured region (~98.0% expected) : 220 ( 94.4%)

Number of residues in allowed region ( ~2.0% expected) : 10 ( 4.3%)

Number of residues in outlier region : 3 ( 1.3%)



Number of residues in favoured region (~98.0% expected) : 220 ( 94.4%)

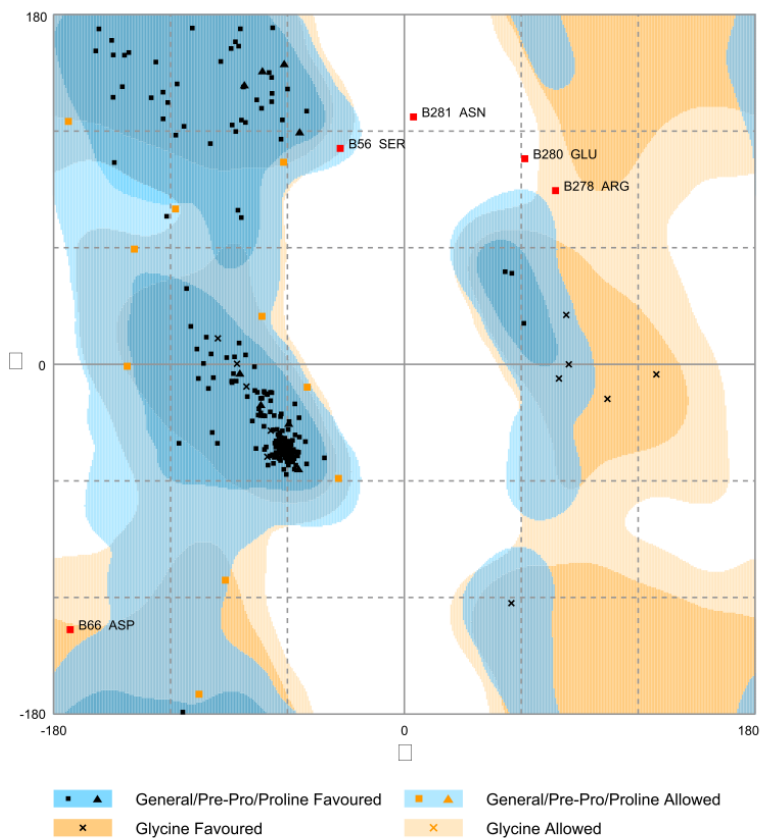
Number of residues in allowed region ( ~2.0% expected) : 10 ( 4.3%)

Number of residues in outlier region : 3 ( 1.3%)

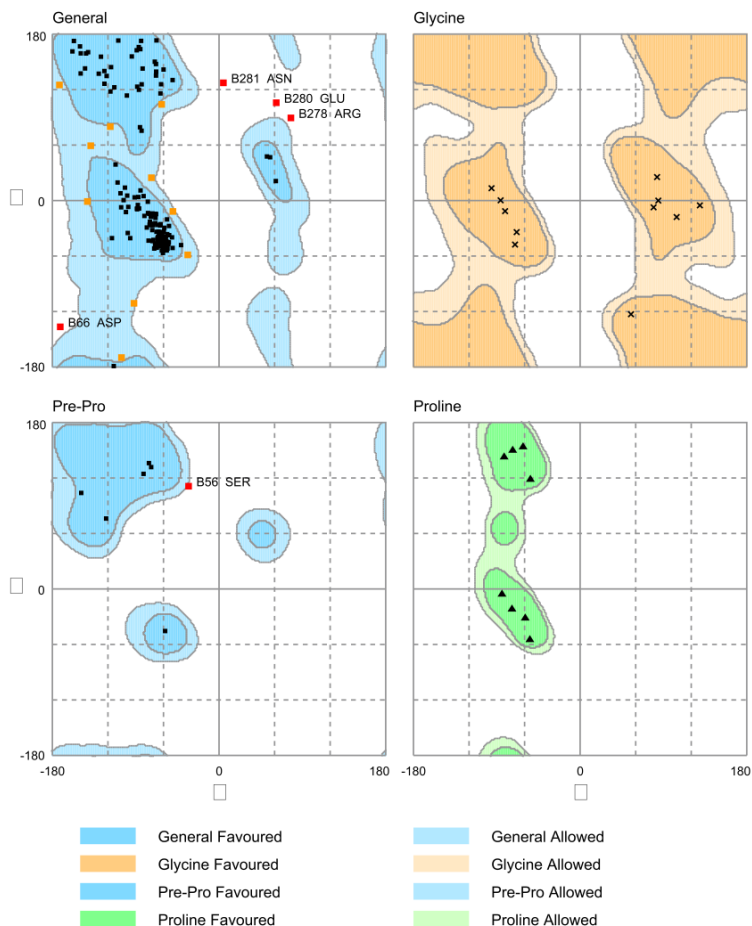
RAMPAGE by Paul de Bakker and Simon Lovell available at <http://www-cryst.bioc.cam.ac.uk/rampage/>  
 Please cite: S.C. Lovell, I.W. Davis, W.B. Arendall III, P.I.W. de Bakker, J.M. Word, M.G. Prisant, J.S. Richardson & D.C. Richardson (2002) Structure validation by  $\alpha$  geometry:  $\phi/\psi$  and  $C\beta$  deviation. Proteins: Structure, Function & Genetics. 50: 437-450



## CgNR1B-RAR



Number of residues in favoured region (~98.0% expected) : 238 ( 94.1%)  
 Number of residues in allowed region ( ~2.0% expected) : 10 ( 4.0%)  
 Number of residues in outlier region : 5 ( 2.0%)



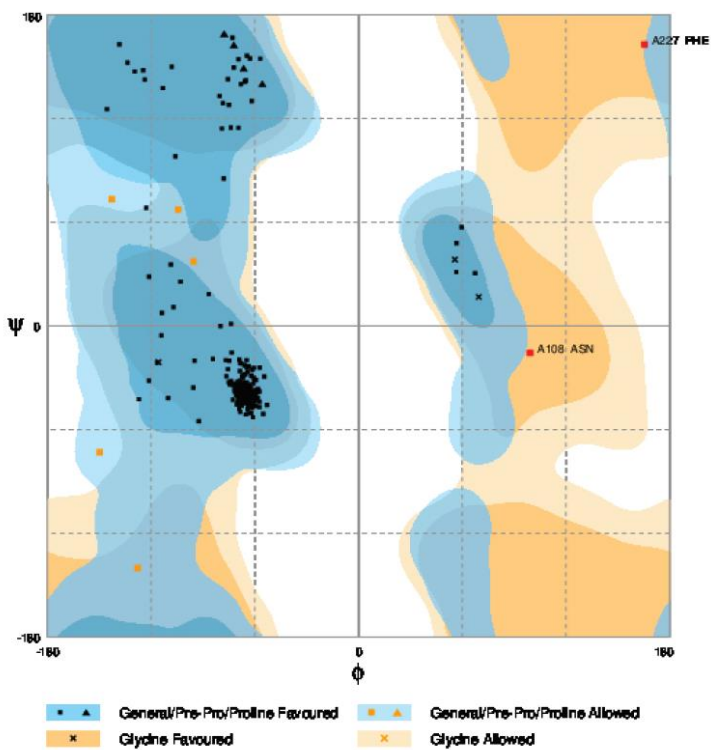
Number of residues in favoured region (~98.0% expected) : 238 (94.1%)

Number of residues in allowed region (~2.0% expected) : 10 (4.0%)

Number of residues in outlier region : 5 (2.0%)

RAMPAGE by Paul de Bakker and Simon Lovell available at <http://www-cryst.bioc.cam.ac.uk/rampage/>  
 Please cite: S.C. Lovell, I.W. Davis, W.B. Arendall III, P.I.W. de Bakker, J.M. Word, M.G. Prisant, J.S. Richardson & D.C. Richardson (2002) Structure validation by  $\alpha$  geometry:  $\phi/\psi$  and  $C\beta$  deviation. *Proteins: Structure, Function & Genetics*. 50: 437-450

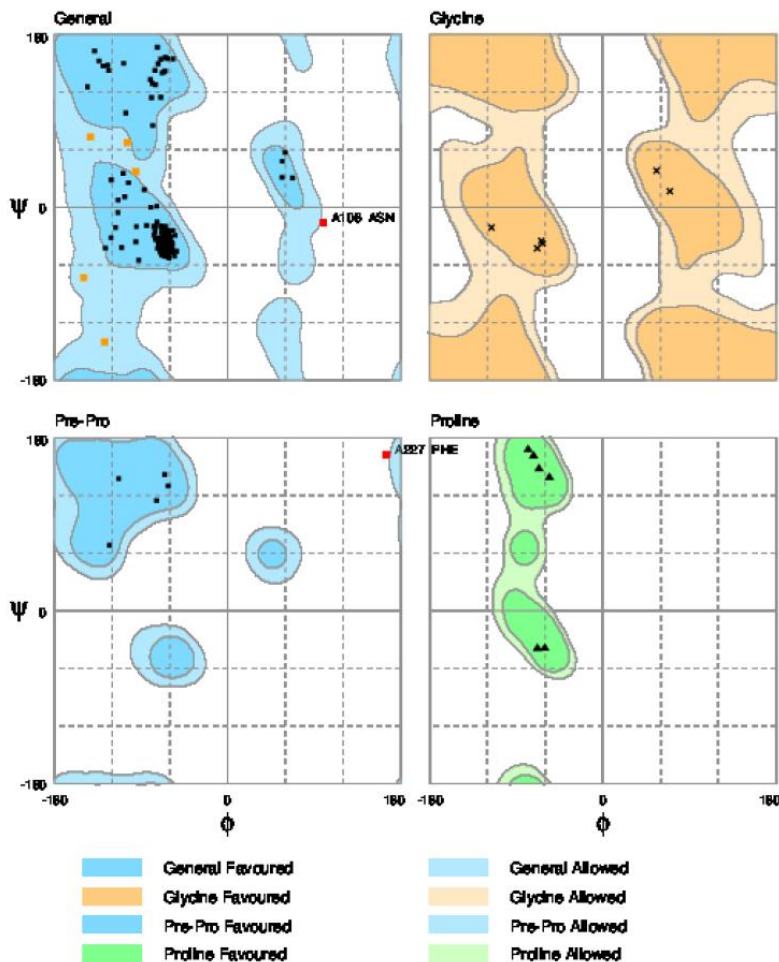
## CgNR1F-ROR



Number of residues in favoured region (~98.0% expected) : 227 ( 97.0%)

Number of residues in allowed region ( ~2.0% expected) : 5 ( 2.1%)

Number of residues in outlier region : 2 ( 0.9%)



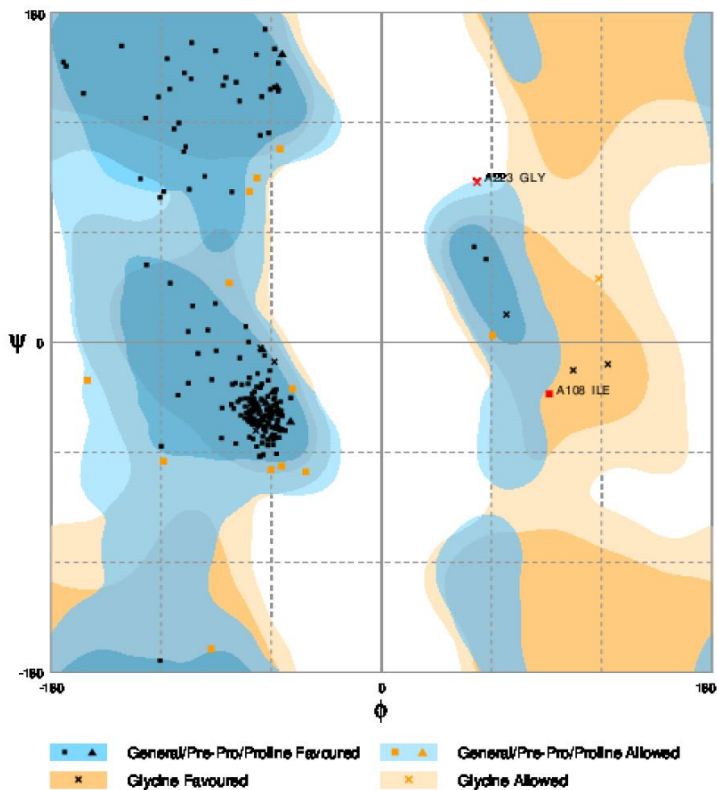
Number of residues in favoured region (~98.0% expected) : 227 ( 97.0%)

Number of residues in allowed region ( ~2.0% expected ) : 5 ( 2.1%)

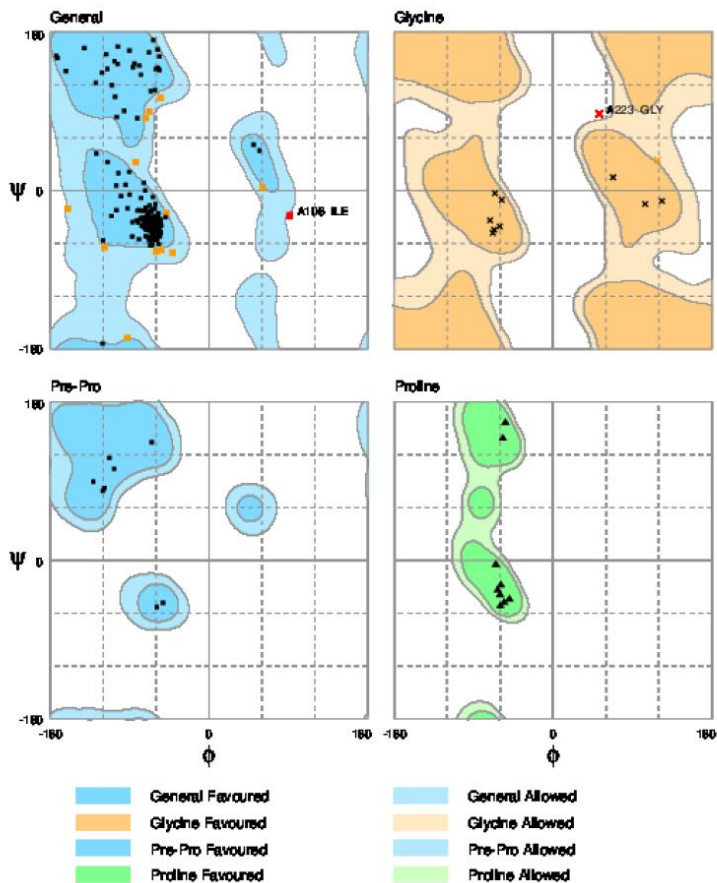
Number of residues in outlier region : 2 ( 0.9%)

RAMPAGE by Paul de Bakker and Simon Lovell available at <http://www-cryst.bioc.cam.ac.uk/rampage/>  
 Please cite: S.C. Lovell, I.W. Davis, W.B. Arendall III, P.I.W. de Bakker, J.M. Word, M.G. Prisant, J.S. Richardson & D.C. Richardson (2002) Structure validation by  $C\alpha$  geometry:  $\phi/\psi$  and  $C\beta$  deviation. Proteins: Structure, Function & Genetics. 50: 437-450

## CgNR2A-HNF4



Number of residues in favoured region (~98.0% expected) : 207 ( 93.2%)  
 Number of residues in allowed region ( ~2.0% expected) : 13 ( 5.9%)  
 Number of residues in outlier region : 2 ( 0.9%)



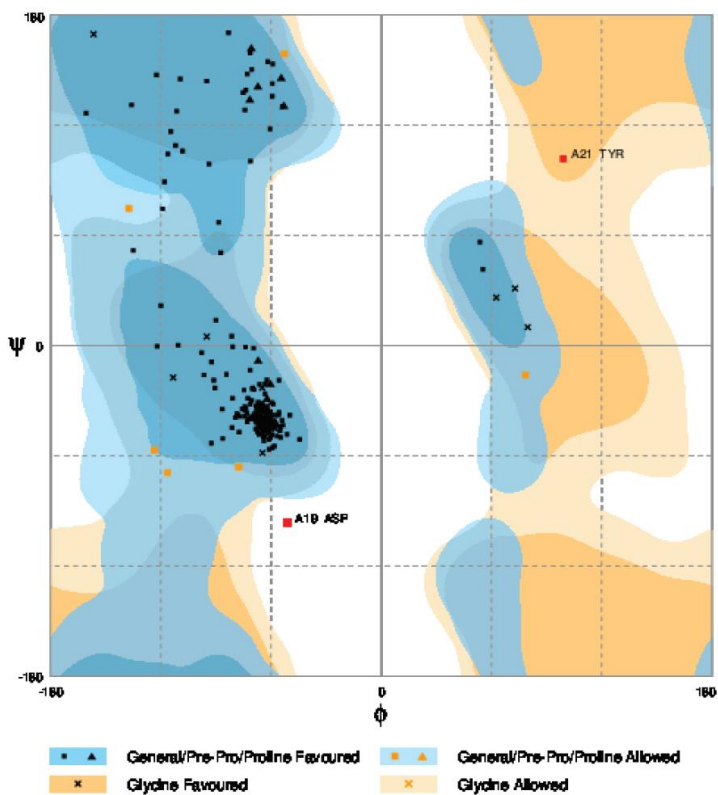
Number of residues in favoured region (~98.0% expected) : 207 ( 93.2%)

Number of residues in allowed region ( ~2.0% expected) : 13 ( 5.9%)

Number of residues in outlier region : 2 ( 0.9%)

RAMPAGE by Paul de Bakker and Simon Lovell available at <http://www-cryst.bioc.cam.ac.uk/rampage/>  
 Please cite: S.C. Lovell, I.W. Davis, W.B. Arendall III, P.I.W. de Bakker, J.M. Word, M.G. Prisant, J.S. Richardson & D.C. Richardson (2002) Structure validation by  $\alpha$  geometry:  $\phi/\psi$  and C $\beta$  deviation. Proteins: Structure, Function & Genetics. 50: 437-450

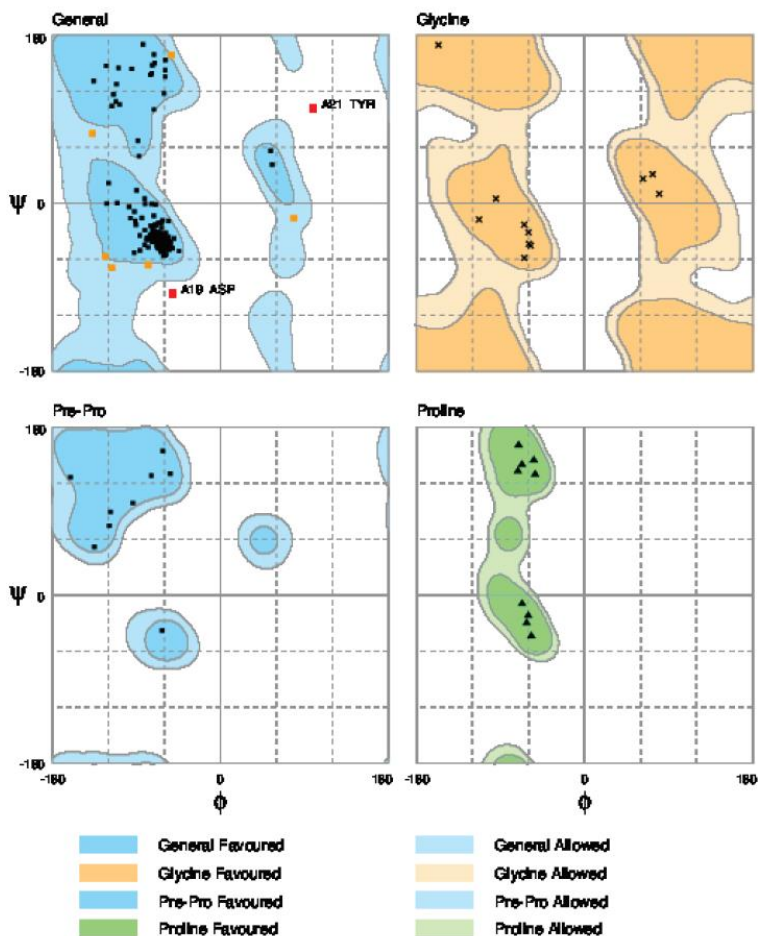
## CgNR2B-RXR



Number of residues in favoured region (~98.0% expected) : 210 ( 96.3%)

Number of residues in allowed region ( ~2.0% expected) : 6 ( 2.8%)

Number of residues in outlier region : 2 ( 0.9%)



Number of residues in favoured region (~98.0% expected) : 210 ( 96.3%)

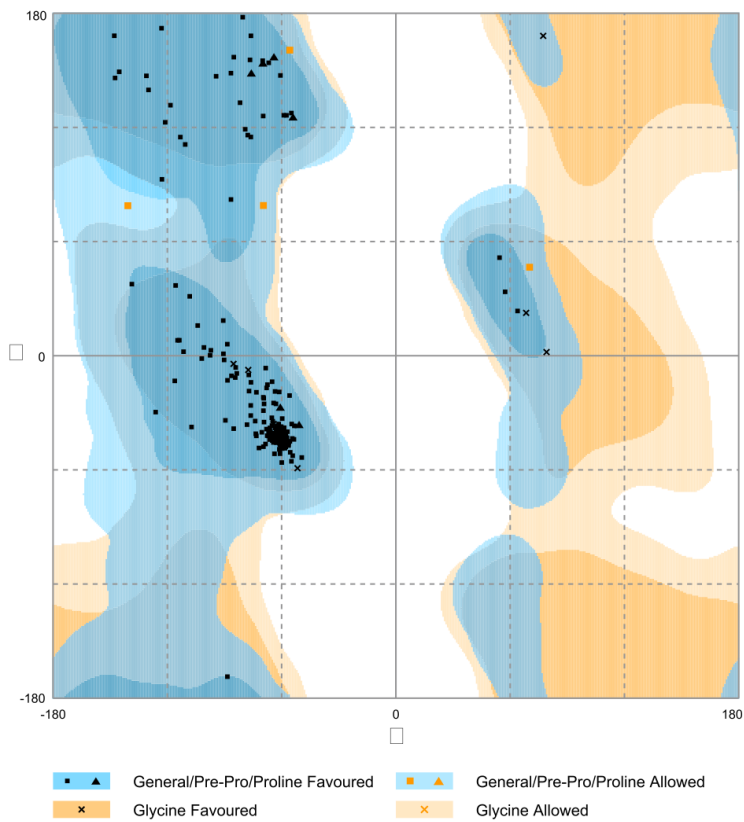
Number of residues in allowed region ( ~2.0% expected) : 6 ( 2.8%)

Number of residues in outlier region : 2 ( 0.9%)

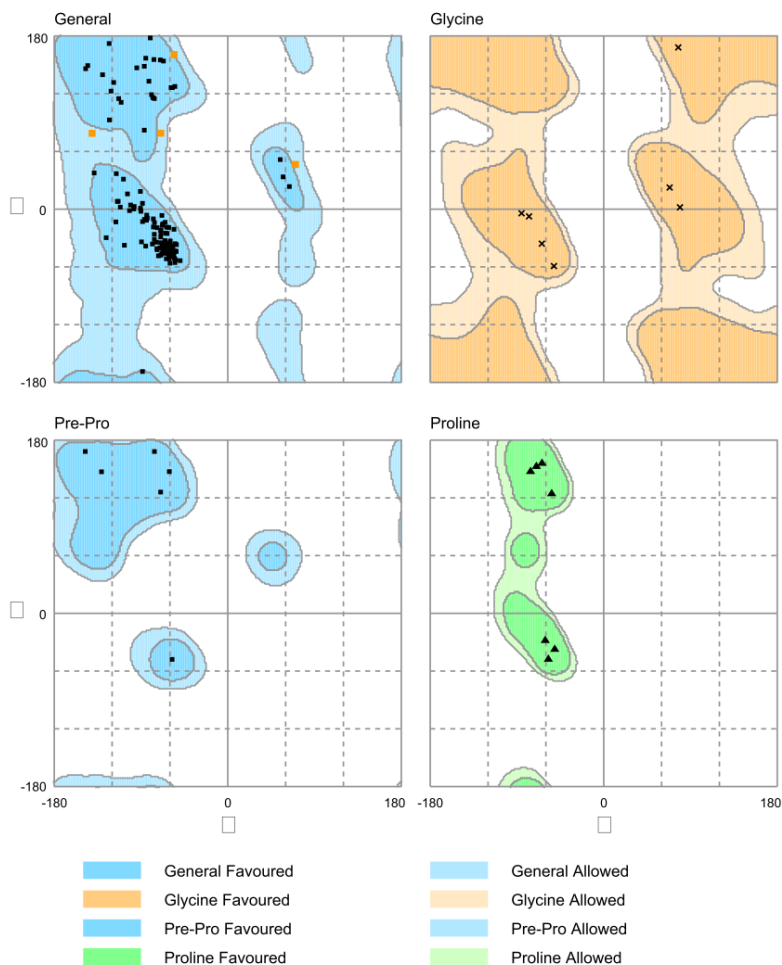
RAMPAGE by Paul de Bakker and Simon Lovell available at <http://www-cryst.bioc.cam.ac.uk/rampage/>  
 Please cite: S.C. Lovell, I.W. Davis, W.B. Arendall III, P.I.W. de Bakker, J.M. Word, M.G. Prisant, J.S. Richardson & D.C. Richardson (2002) Structure validation by  $\alpha$  geometry:  $\phi$ / $\psi$  and C $\beta$  deviation. Proteins: Structure, Function & Genetics. 50: 437-450



CgNR3A-ER



Number of residues in favoured region (~98.0% expected) : 215 ( 98.2%)  
Number of residues in allowed region (~2.0% expected) : 4 ( 1.8%)  
Number of residues in outlier region : 0 ( 0.0%)



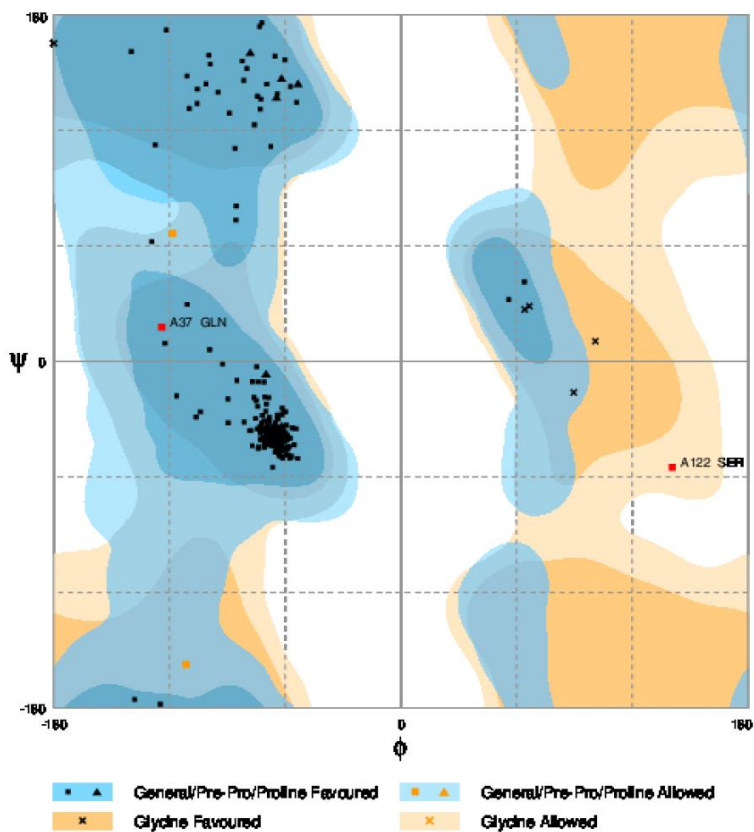
Number of residues in favoured region (~98.0% expected) : 215 ( 98.2%)

Number of residues in allowed region (~2.0% expected) : 4 ( 1.8%)

Number of residues in outlier region : 0 ( 0.0%)

RAMPAGE by Paul de Bakker and Simon Lovell available at <http://www-cryst.bioc.cam.ac.uk/rampage/>  
 Please cite: S.C. Lovell, I.W. Davis, W.B. Arendall III, P.I.W. de Bakker, J.M. Word, M.G. Prisant, J.S. Richardson & D.C. Richardson (2002) Structure validation by  $\alpha$  geometry:  $\phi/\psi$  and  $C\beta$  deviation. *Proteins: Structure, Function & Genetics*. 50: 437-450

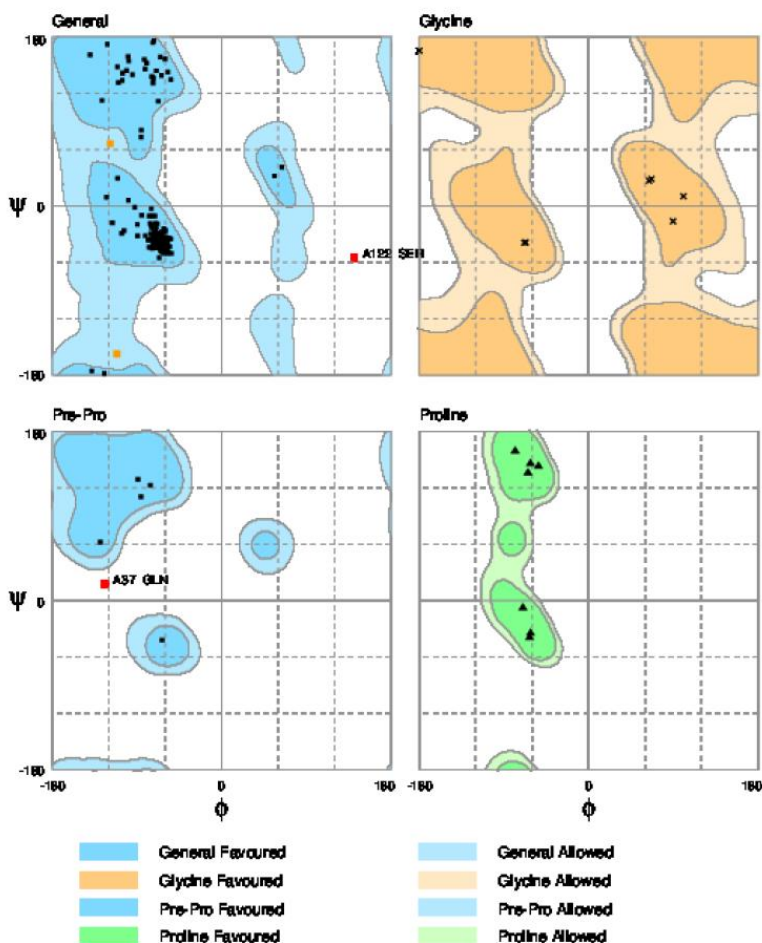
## CgNR5A-NR5A



Number of residues in favoured region (~98.0% expected) : 231 ( 98.3%)

Number of residues in allowed region ( ~2.0% expected) : 2 ( 0.9%)

Number of residues in outlier region : 2 ( 0.9%)

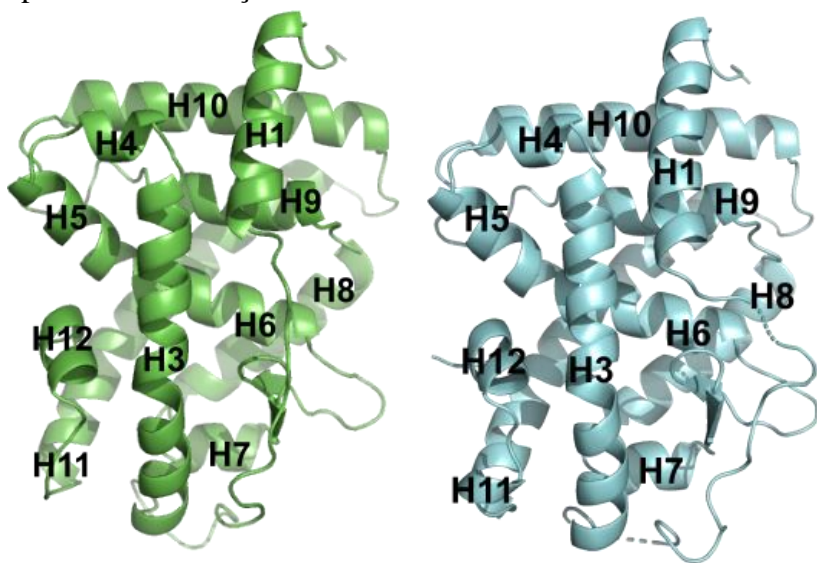


Number of residues in favoured region (~98.0% expected) : 231 ( 98.3%)  
 Number of residues in allowed region ( ~2.0% expected) : 2 ( 0.9%)  
 Number of residues in outlier region : 2 ( 0.9%)

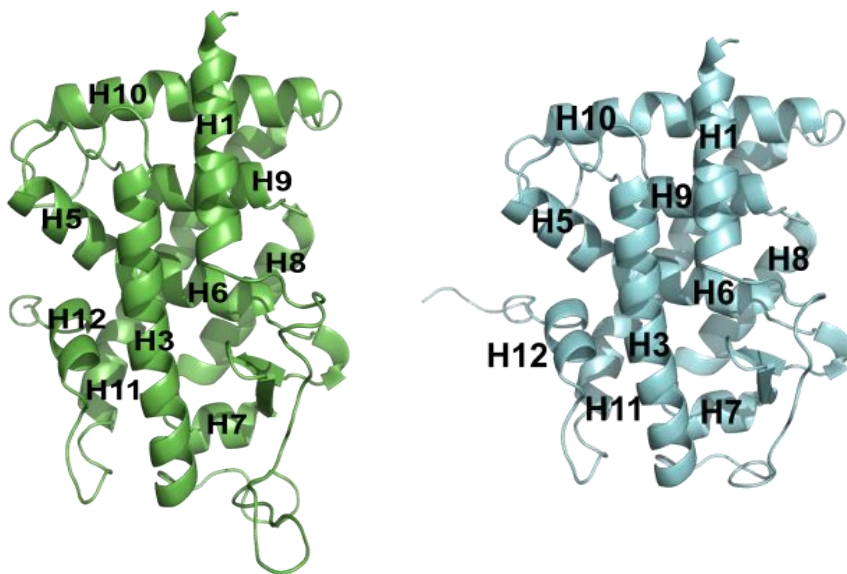
RAMPAGE by Paul de Bakker and Simon Lovell available at <http://www-cryst.bioc.cam.ac.uk/rampage/>  
 Please cite: S.C. Lovell, I.W. Davis, W.B. Arendall III, P.I.W. de Bakker, J.M. Word, M.G. Prisant, J.S. Richardson & D.C. Richardson (2002) Structure validation by  $C\alpha$  geometry:  $\phi/\psi$  and  $C\beta$  deviation. Proteins: Structure, Function & Genetics. 50: 437-450

## APÊNDICE B – Modelos comparativos e seus respectivos *templates*.

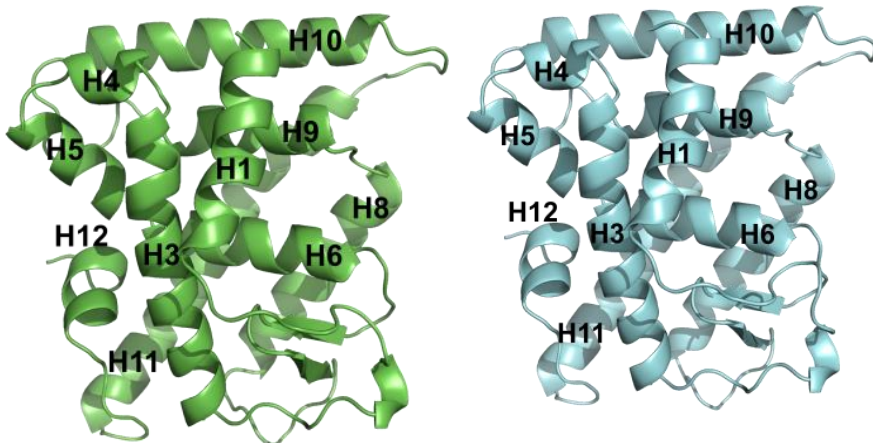
**Figura 10-** Em verde o modelo de CgTHR com 11  $\alpha$ -hélices bem definidas e um grampo- $\beta$ . Já em azul o cristal de 1N46 com as mesmas regiões bem definidas e algumas falhas na região de *loop* entre H1 e H2. Ambas as estruturas não apresentam formação de H2.



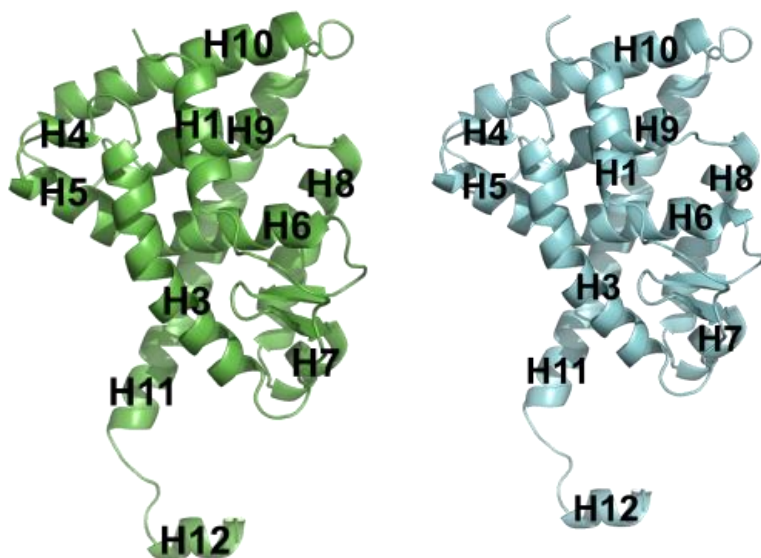
**Figura 11** – À esquerda em verde o modelo CgRAR e a esquerda em azul a estrutura experimental de 1XDK. Ambos os modelos tridimensionais apresentam um grampo- $\beta$  e 10  $\alpha$ -hélices com uma H4 não definida e ausência de H2. Também diferem quanto a região de *loop* entre H1 e H3, sendo o *loop* de CgRAR maior do que 1XDK.



**Figura 12** – Ambas as estruturas, CgHNF4 em verde e 4IQR em azul, apresentam 11  $\alpha$ -hélices mais um grampo- $\beta$  e a região H2 é ausente.

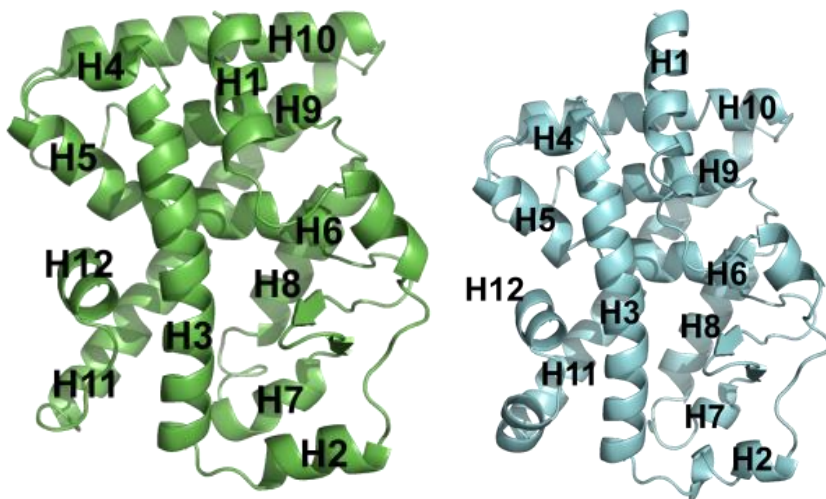


**Figura 13** – Em verde à esquerda, CgRXR e em azul à direita 1XIU. As duas estruturas apresentam 11  $\alpha$ -hélices mais um grampo- $\beta$  com a ausência de H2 e formação discreta de H4.





**Figura 14** – Em verde o modelo de CgROR com a formação de um grampo- $\beta$ , 12  $\alpha$ -hélices e mais uma H2' adicional típica desta família. O cristal de 4S15 em azul apresenta as mesmas regiões, porém, a H2 não é tão bem definida como em CgROR.



**APÊNDICE C – Valores calculados para superfície de área e volume para cada modelo e seu respectivo cristal de modelagem.**

<b>Receptor</b>	<b>Área (Å<sup>2</sup>)</b>	<b>Volume (Å<sup>3</sup>)</b>
CgNR1A	470,917	228,939
1N46	390,002	227,071
2H77	446,837	221,425
4LNX	389,86	216,061
CgNR1B	282,384	131,041
1XDK	315,706	141,611
CgNR1F	563,615	369,084
4S15	475,855	321,311
CgNR1H	616,623	303,215
2NXX	407,308	225,900
CgNR2A	569,898	292,371
4IQR	705,46	364,839
CgNR2B	497,136	298,701
1XIU	575,768	343,801
CgNR3A	270,132	91,341
1GWR	445,637	265,851
4N1Y	157,573	78,744
CgNR5A	673,745	461,862
4ONI	573,75	481,244

**APÊNDICE D - Lista do levantamento de ligantes  
experimentais para cada membro da superfamília de  
Receptores Nucleares.**

<b>NR1A-THR</b>			
<b>Organismo</b>	<b>Cód. PDB</b>	<b>Ligante</b>	<b>Referência</b>
<i>Homo sapiens</i>	1N46	PFA	(DOW et al., 2003)
<i>Homo sapiens</i>	3D57	4HY	(JOURAVEL et al., 2009)
<i>Homo sapiens</i>	2H77	T3	(NASCIMENTO et al., 2006)
<i>Homo sapiens</i>	2H79	T3	(NASCIMENTO et al., 2006)
<i>Homo sapiens</i>	4LNX	T44	(SOUZA et al., 2014)
<i>Homo sapiens</i>	3IMY	B72	(BLEICHER et al., 2008)
<b>NR1B-RAR</b>			
<b>Organismo</b>	<b>Cód. PDB</b>	<b>Ligante</b>	<b>Referência</b>
<i>Mus musculus</i>	1XDK	9CR	(POGENBERG et al., 2005)
<i>Homo sapiens</i>	3LBD	9CR	(KLAHOLZ et al., 1998)
<i>Homo sapiens</i>	3A9E	REA	(SATO et al., 2010)
<i>Homo sapiens</i>	2LBD	REA	(RENAUD et al., 1995)
<i>Mus musculus</i>	1DKF	BMS	(BOURGUET et al., 2000)
<i>Homo sapiens</i>	5K13	6Q7	(HUGHES et al., 2016)
<i>Homo sapiens</i>	1XAP	TTB	(GERMAIN et al., 2004)
<i>Homo sapiens</i>	3KMR	EQN	(LE MAIRE et al., 2010)

NR1F-ROR			
Organismo	Cód. PDB	Ligante	Referência
<i>Homo sapiens</i>	4S15	4D8	(SANTORI et al., 2015)
<i>Homo sapiens</i>	4QM0	39K	(FAUBER et al., 2014)
<i>Homo sapiens</i>	5AYG	4LQ	(HIRATA et al., 2016)
<i>Rattus norvegicus</i>	1K4W	STE	(STEHLIN et al., 2001)
<i>Homo sapiens</i>	4YPQ	4F1	(SCHEEPSTRA et al., 2015)
<i>Homo sapiens</i>	4ZOM	4Q3	(WANG et al., 2015)
<i>Homo sapiens</i>	1N83	CLR	(KALLEN et al., 2002)
<i>Homo sapiens</i>	3B0W	DGX	(FUJITA-SATO et al., 2011)
<i>Homo sapiens</i>	4NIE	NBH / DMX	(YANG et al., 2013)
<i>Homo sapiens</i>	5K3L	444	Dados não publicados
<i>Homo sapiens</i>	5K3M	6Q5	Dados não publicados
<i>Nomascus leucogenys</i>	5X8S	6Q5	(NOGUCHI et al., 2017)

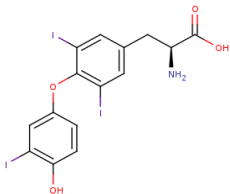
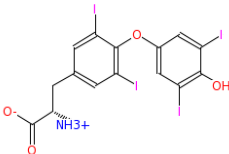
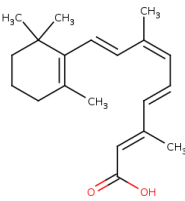
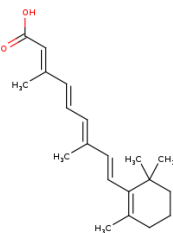
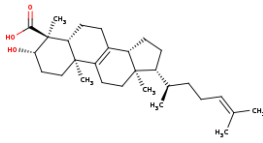
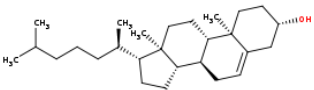
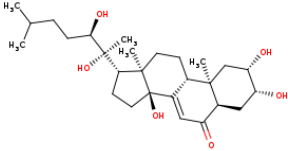
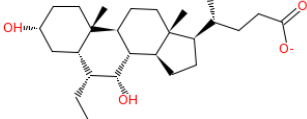
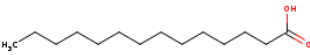
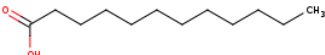
NR1H-ECR/LXR/FXR			
Organismo	Cód. PDB	Ligante	Referência
<i>Tribolium castaneum</i> - ECR	2NXX	P1A	(IWEMA et al., 2007)
<i>Mus musculus</i> - LXR	2ACL	L05	(JAYE et al., 2005)
<i>Homo sapiens</i> - LXR	5JY3	6OX	(KICK et al., 2016)
<i>Homo sapiens</i> - LXR	4NQA	965	(LOU et al., 2014)
<i>Homo sapiens</i> -LXR	5KYA	6Y4	(TICE et al., 2016)
<i>Homo sapiens</i> -LXR	5KYJ	6Y8	(TICE et al., 2016)
<i>Homo sapiens</i> -LXR	4NQA	965	(LOU et al., 2014)
<i>Homo sapiens</i> -LXR	3L0E	G58	(ZUERCHER et al., 2010)
<i>Rattus norvegicus</i> -FXR	1OT7	CHC /IU5	(MI et al., 2003)
<i>Homo sapiens</i> -LXR	1UHL	444	(SVENSSON, 2003)

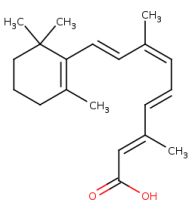
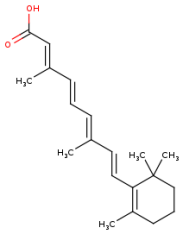
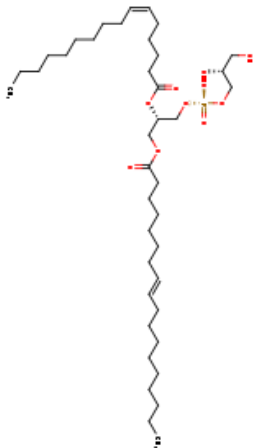
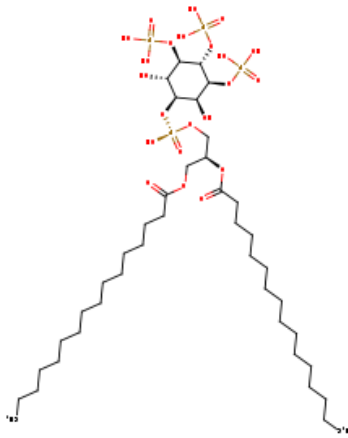
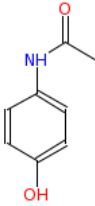
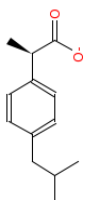
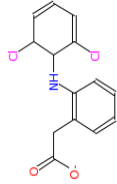
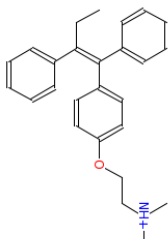
NR2A-HNF4			
Organismo	Cód. PDB	Ligante	Referência
<i>Homo sapiens</i>	1PZL	MYR	(DUDA; CHI; SHOELSON, 2004)
<i>Rattus rattus</i>	1M7W	DAO	(DHE-PAGANON et al., 2002)
<i>Homo sapiens</i>	3FS1	MYR	(RHA et al., 2009)
<i>Homo sapiens</i>	4IQR	MYR	(CHANDRA et al., 2013)
<i>Rattus rattus</i>		LA	(YUAN et al., 2009)

NR2B-RXR			
Organismo	Cód. PDB	Ligante	Referência
<i>Biomphalaria glabrata</i>	1XIU.A	9CR	(DE GROOT et al., 2005)
<i>Homo sapiens</i>	2PIT	3TN	(NAHOUM et al., 2007)
<i>Homo sapiens</i>	1XLS	9CR	(SUINO et al., 2004)
<i>Homo sapiens</i>	2ACL	REA	(JAYE et al., 2005)
<i>Homo sapiens</i>	1XV9	F15	(XU et al., 2004)
<i>Mus musculus</i>	1DKF	OLA	(BOURGUET et al., 2000)
<i>Homo sapiens</i>	1MZN	BM6	(EGEA; MITSCHLER; MORAS, 2002)

LRH1 - NR5A			
Organismo	Cód. PDB	Ligante	Referência
<i>Homo sapiens</i>	4ONI	P6L / EPH	Dados não publicados
<i>Homo sapiens</i>	5UNJ	RJW	(MAYS et al., 2017)
<i>Homo sapiens</i>	5SYZ	71W	(MAYS et al., 2016)
<i>Homo sapiens</i>	4PLD	CPS	(MUSILLE et al., 2016)
<i>Homo sapiens</i>	4PLE	CPS / EPH	(MUSILLE et al., 2016)
<i>Homo sapiens</i>	4RWV	PIZ	Dados não publicados
<i>Homo sapiens</i>	3TX7	P6L	(YUMOTO et al., 2012)
<i>Homo sapiens</i>	1YOK	P6L	(KRYLOVA et al., 2005)
<i>Homo sapiens</i>	1YUC	GOL / EPH	(ORTLUND et al., 2005)
<i>Homo sapiens</i>	4DOR	EPH	(MUSILLE et al., 2012)

## APÊNDICE E – Lista de ligantes selecionados para *docking* molecular.

Ligantes conhecidos em mamífero	
<b>CgTHR</b>	 <chem>O=C(O)[C@H](N)Cc1cc(I)c(Oc2ccc(O)cc2)cc1I</chem> <b>T3</b>  <chem>OC1=CC(=C(OC2=CC(=C(O)C=C2)C=C2)C=C2)C=C1[NH3+]</chem> <b>T4</b>
<b>CgRAR</b>	 <chem>CC(C)(C)C=C(C)C=C(C)C=C(C)C(=O)O</chem> <b>9CR</b>  <chem>CC(C)(C)C=C(C)C=C(C)C=C(C)C(=O)O</chem> <b>REA</b>
<b>CgROR</b>	 <chem>CC(C)C=C(C)C=C(C)C(=O)O</chem> <b>4D8</b>  <chem>CC(C)C=C(C)C=C(C)C(=O)O</chem> <b>CLR</b>
<b>CgNR1H</b>	 <chem>CC(C)C=C(C)C=C(C)C(=O)O</chem> <b>P1A</b>  <chem>CC(C)C=C(C)C=C(C)C(=O)O</chem> <b>CHC</b>
<b>CgHNF4</b>	 <chem>CCCCCCCCCCCCCCCCCCCC(=O)O</chem> <b>MYR</b>  <chem>CCCCCCCCCCCCCCCCCCCC(=O)O</chem> <b>DAO</b>

<b>CgRXR</b>			
	<b>9CR</b>	<b>REA</b>	
<b>CgNR5A</b>			
	<b>P6L</b>	<b>PIZ</b>	
<b>Fármacos</b>			
			
<b>Paracetamol</b>	<b>Ibuprofeno</b>	<b>Diclofenaco</b>	<b>Tamoxifeno</b>

Fonte: Zinc database e PDB (Protein Data Bank)



# ANEXO A – Colaboração em artigos científicos

Molecular and Cellular Endocrinology 470 (2018) 281–294



Contents lists available at ScienceDirect

Molecular and Cellular Endocrinology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/mce](http://www.elsevier.com/locate/mce)



## Reverse T<sub>3</sub> interacts with $\alpha$ v $\beta$ 3 integrin receptor and restores enzyme activities in the hippocampus of hypothyroid developing rats: Insight on signaling mechanisms



Juliana Tonietto Domingues<sup>a,b</sup>, Daiane Cattani<sup>a</sup>, Patricia Acordi Cesconetto<sup>a</sup>,  
Bianka Alzira Nascimento de Almeida<sup>a</sup>, Paula Pierozan<sup>c</sup>, Karin dos Santos<sup>a</sup>,  
Guilherme Razzera<sup>a</sup>, Fátima Regina Mena Barreto Silva<sup>a</sup>, Regina Pessoa-Pureur<sup>c</sup>,  
Ariane Zamoner<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Biologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil

<sup>b</sup> Programa de Pós-Graduação em Biologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil

<sup>c</sup> Departamento de Biologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

### ARTICLE INFO

Article history:  
Received 11 September 2017  
Received in revised form  
10 November 2017  
Accepted 15 November 2017  
Available online 16 November 2017

Keywords:  
3,3',5'-triiodothyronine (reverse T<sub>3</sub>, rT<sub>3</sub>)  
Thyroid hormone  
Nongenomic effects  
Modelling  
glutamate  
Integrins

### ABSTRACT

In the present study we provide evidence that 3,3',5'-triiodothyronine (reverse T<sub>3</sub>, rT<sub>3</sub>) restores neurochemical parameters induced by congenital hypothyroidism in rat hippocampus. Congenital hypothyroidism was induced by adding 0.05% propylthiouracil in the drinking water from gestation day 8 and continually up to lactation day 15. In the *in vivo* rT<sub>3</sub> exposure, hypothyroid 12-day old pups were daily injected with rT<sub>3</sub> (50 ng/kg body weight) or saline until day 14. In the *ex vivo* rT<sub>3</sub> treatment, hippocampal slices from 15-day-old hypothyroid pups were incubated for 30 min with or without rT<sub>3</sub> (1 nM). We found that *ex vivo* and *in vivo* exposure to rT<sub>3</sub> failed in restoring the decreased <sup>14</sup>C-glutamate uptake; however, restored the phosphorylation of glial fibrillary acidic protein (GFAP), <sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup> influx, aspartate transaminase (AST), glutamine synthetase (GS) and gamma-glutamyl transferase (GGT) activities, as well as glutathione (GSH) levels in hypothyroid hippocampus. In addition, rT<sub>3</sub> improved <sup>14</sup>C-2-deoxy-D-glucose uptake and lactate dehydrogenase (LDH) activity. Receptor agonists/antagonists (RGD peptide and AP-5), kinase inhibitors of p38MAPK, ERK1/2, CaMKII, PKA (SB239063, PD98059, KNEB and H89, respectively), L-type voltage-dependent calcium channel blocker (nifedipine) and intracellular calcium chelator (BAPTA-AM) were used to determine the mechanisms of the nongenomic rT<sub>3</sub> action on GGT activity. Using molecular docking analysis, we found rT<sub>3</sub> interaction with  $\alpha$ v $\beta$ 3 integrin receptors, non-genomically activating signaling pathways (PKA, CaMKII, p38MAPK) that restored GGT activity. We provide evidence that rT<sub>3</sub> is an active TH metabolite and our results represent an important contribution to elucidate the nonclassical mechanism of action of this metabolite in hypothyroidism.

© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Thyroid hormones (TH), 3,5,3',5'-triiodo-L-thyronine (T<sub>3</sub>) and thyroxine (T<sub>4</sub>), are involved in metabolic and physiological functions of several tissues, being crucial for neural development and function (Bernal, 2007; Bernal et al., 2003). The classical

mechanism of hormone action involves the modulation of gene expression. However, several evidence point to nongenomic mechanisms of TH in different cell types, including neural cells (Dusart and Flamant, 2012; Morte and Bernal, 2014; Galton et al., 2007; Zamoner et al., 2005; Manzano et al., 2007; Gilbert et al., 2007; Madeira et al., 1988; Zamoner et al., 2007a, 2011; Schmohl et al., 2015; Zamoner et al., 2011; Lischinsky et al., 2016; Zanatta et al., 2013a; Bernal et al., 2003). The nongenomic actions of TH might be associated with surface receptors, as well as kinase- and/or calcium-activated signaling pathways (Morte and Bernal, 2014; Gilbert et al., 2007; Zamoner et al., 2007a; Schmohl et al., 2015;

\* Corresponding author. Departamento de Biologia, Centro de Ciências Biológicas, UFSC, Campus Universitário, Bairro Cônego Grande, Lab 901, bloco C, térreo, CEP: 88040-970, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil.

E-mail address: [arlane.zamoner@ufsc.br](mailto:arlane.zamoner@ufsc.br) (A. Zamoner).



Contents lists available at ScienceDirect

Molecular and Cellular Endocrinology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/mce](http://www.elsevier.com/locate/mce)

## Experimentally-induced maternal hypothyroidism alters enzyme activities and the sensorimotor cortex of the offspring rats

Juliana Tonietto Domingues<sup>a</sup>, Carolinne Sayury Wajima<sup>a</sup>, Patricia Acordi Cesconetto<sup>a</sup>, Eduardo Benedetti Parisotto<sup>a</sup>, Elisa Winkelmann-Duarte<sup>b</sup>, Karin dos Santos<sup>a</sup>, Najla Saleh<sup>c</sup>, Fabíola Branco Filippin-Monteiro<sup>d</sup>, Guilherme Razzera<sup>a</sup>, Fátima Regina Mena Barreto Silva<sup>a</sup>, Regina Pessoa-Pureur<sup>d</sup>, Ariane Zamoner<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil

<sup>b</sup> Departamento de Ciências Morfológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil

<sup>c</sup> Departamento de Análises Clínicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil

<sup>d</sup> Departamento de Biologia, Instituto de Ciências Biológicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Hypothyroidism  
Cytoskeleton  
Redox imbalance  
Cholinergic enzyme  
Calcium  
GRAP

### ABSTRACT

In this study, we used an experimental model of congenital hypothyroidism to show that deficient thyroid hormones (TH) disrupt different neurochemical, morphological and functional aspects in the cerebral cortex of 15-day-old offspring. Our results showing decreased glutamine synthetase (GS) activity and  $\text{Ca}^{2+}$  overload in the cerebral cortex of hypothyroid pups suggest misregulated glutamate metabolism associated with developmentally induced TH deficiency. The  $^{14}\text{C}$ -MeAIB accumulation indicates upregulated System A activity and glutamate uptake by neurons. Energy metabolism in hypothyroid cortical slices was preserved, as demonstrated by unaltered glucose metabolism. We also found upregulated acetylcholinesterase activity, depleting acetylcholine from the synaptic cleft, pointing to disrupted cholinergic system. Increased reactive oxygen species (ROS) generation, lipid peroxidation, glutathione (GSH) depletion, which were associated with glutathione peroxidase, superoxide dismutase and gamma-glutamyltransferase downregulation suggest redox imbalance. Disrupted astrocyte cytoskeleton was evidenced by downregulated and hyperphosphorylated glial fibrillary acidic protein (GRAP). Morphological and structural characterization of the sensorimotor cerebral cortex (SCC) showed unaltered thickness of the SCC. However, decreased size of neurons on the layers II & III and IV in the right SCC and increased NeuN positive neurons in specific SCC layers, suggest that they are differently affected by the low TH levels during neurodevelopment. Hypothyroid pups presented increased number of foot-faults in the gridwalk test indicating affected motor functions. Taken together, our results show that congenital hypothyroidism disrupts glutamatergic and cholinergic neurotransmission,  $\text{Ca}^{2+}$  equilibrium, redox balance, cytoskeleton integrity, morphological and functional aspects in the cerebral cortex of young rats.

### 1. Introduction

Thyroid hormones (TH) are critically involved in the development and function of the central nervous system (CNS). The TH deficiency during critical periods in early life may lead to severe and permanent brain damage. The nuclear receptors for TH are present in mammalian brain during development (Bernal, 2003; Bernal et al., 2003; Anderson, 2001; Ahmed, 2015). Once in the developing CNS, TH exert a number of important effects, and at the end of gestation TH control the expression of genes involved in cytoskeletal biogenesis, neuronal

migration, neurite outgrowth and branching in the cerebral cortex (Schwartz et al., 1997; Sampson et al., 2000; Dowling et al., 2001; Chatonnet et al., 2015). It has been described that the fetal rat brain is not permeable to 3,5,3'-triiodo-L-thyronine ( $\text{T}_3$ ) and that all  $\text{T}_3$  present in the brain of these animals comes from maternal thyroxine ( $\text{T}_4$ ) (Calvo et al., 1990). During fetal life,  $\text{T}_4$  is able to cross the placenta and the blood-brain barrier, and once inside the brain it can be deiodinated to  $\text{T}_3$  (Grijoto-Martínez et al., 2011). On the other hand, in adult rats the concentration of  $\text{T}_3$  within the brain comes from serum or it is produced predominantly from  $\text{T}_4$  through deiodination (Galton et al., 2007).

\* Corresponding author. Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, UFSC. Campus Universitário, Bairro Córrego Grande, Lab 101, Bloco C, térreo, CEP: 88040-970, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil.

E-mail address: [arianezp@gmail.com](mailto:arianezp@gmail.com), [arianezp@ufsc.br](mailto:arianezp@ufsc.br) (A. Zamoner).

<https://doi.org/10.1016/j.mce.2018.07.008>

Received 6 February 2018; Received in revised form 17 July 2018; Accepted 17 July 2018  
0303-7207/© 2018 Published by Elsevier B.V.